

Aus der Universitäts-Frauenklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. R. Kepp

DAS VERHALTEN FREIER AMINOSÄUREN
IM KANINCHENBLUTSERUM
NACH INTRAABDOMINALER RADIOGOLD-INSTILLATION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Hans-Joachim Schwarz
aus Hildburghausen

1969

Gießen 1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Universitäts-Frauenklinik
der Justus Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. R. Kepp

DAS VERHALTEN FREIER AMINOSÄUREN
IM KANINCHENBLUTSERUM
NACH INTRAABDOMINALER RADIOGOLD-INSTILLATION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von
Hans-Joachim Schwarz
aus Hildburghausen

Gießen 1968

Aus der Universitäts-Frauenklinik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Prof. Dr. med. R. Kapp

Dekan : Professor Dr. med. H. Rettig

Referent : Priv. Doz. Dr. med. C. F. Michel

Korreferent : Professor Dr. Dr. G. Barth

DAS VERHALTEN FREIER AMINOSÄUREN
IM KAMMCHENBLUTSERUM
NACH INTRAABDOMINALER RADIOLOGISCHER

Tag der mündlichen Prüfung : 11. März 1969



Vorgelegt von
Hans-Joachim Schwarz
an Hohenheim

Das Verhalten freier Aminosäuren im Kaninchenblut-
serum nach intraabdominaler Radiogold-Instillation.

Gliederung:	Seite
1 <u>EINLEITUNG:</u>	1
1,0 Die Entwicklung der Strahlentherapie und die zunehmende Bedeutung der Strahlenbiologie.	1
1,1 Fragestellung	1
1,2 Der Eiweißstoffwechsel und seine zentrale Stellung im Organismus	2
1,21 Aufnahme, Resorption, Transport, Spei- cherung und Ausscheidung des Eiweißes und seiner Bausteine	2
1,22 Der Einfluß endogener und exogener Vor- gänge auf den Proteinstoffwechsel	3
2 <u>MATERIAL UND METHODE</u>	4
2,0 Versuchstiere (Tabelle I)	4
2,1 Blutentnahme und Zeitpunkt	4
2,2 Gewinnung und Lagerung von Seren	4
2,3 ¹⁹⁸ AU und seine Applikation	5
2,4 Apparatur und Prinzip	5
2,41 Chromatographisches System	5
2,42 Analytisches System	6
2,5 Reagenzien und ihre Zubereitung	7
2,51 Aminosäuretestlösung	7
2,52 Citratpuffer	8
2,53 Ninhydrinreagenz	9
2,54 Azetatpuffer	9
2,6 Aufbereitung der Seren	10
2,7 Harzaufbereitung	10
2,8 Regeneration der Säule und Reinigung des analytischen Systems	11
2,9 Externer und interner Standard	11

	Seite
3 <u>ERGEBNISSE</u>	
3,0 Chromatogramme und ihre Auswertung	12
3,1 Berechnung der Kurvenflächen	12
3,2 Testchromatogramme	13
3,3 Ermittlung der Fehlerbreite (Tabelle II)	13
3,4 Ergebnisse der 65 Serumchromatogramme (Tabelle III)	15
3,5 Mittelwerte und Streuung (Tabelle IV)	15
3,6 Signifikanzberechnung für Paardifferenzen nach Wilcoxon (Tabelle V)	15
3,7 Darstellung der Veränderungen der einzelnen Aminosäuren nach Radiogoldgabe	16
4 <u>DISKUSSION</u>	33
4,0 Die Strahlenbelastung durch Radiogold	33
4,1 Die strahlenbedingten histologischen veränderungen am Gewebe der Bauchraum- organe	34
4,2 Konzentrationsänderungen im Kaninchen- blutserum und ihre Interpretation	35
5 <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	38
6 <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	40

EINLEITUNG

Seitdem 1945 bis 1949 J.H. M ü l l e r (1955) erstmals radioaktives Gold ¹⁹⁸AU in kolloider Lösung intrakavitär, d.h. intraabdominal bzw. intrapleural, anwandte und dabei günstigste Heilerfolge erzielte, hat die Anwendung von ¹⁹⁸AU Eingang in die gynäkologische Strahlentherapie gefunden. Bei dieser Applikationsart ist die Frage nach der strahlenbedingten Schädigung aller im Bauchraum gelegenen Organe sowie der Nachbarorgane des Bauchraumes zu diskutieren. Die frühzeitige Erfassung von Strahlenschäden ist mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Da in einzelnen Untersuchungen Veränderungen im Stoffwechsel der Aminosäuren nach Bestrahlung festgestellt worden waren, (B o h o u n 1963, L a d n e r 1967) sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Bestimmung der freien Aminosäuren im Serum Aufschlüsse über den Strahleninsult gibt. Das bisherige Wissen um diesen Einfluß ionisierender Strahlen auf den Eiweißstoffwechsel basiert vor allem auf Untersuchungen von K a y (1957), L a n g e n d o r f f (1961) M e l c h i n g, S t r e f f e r (1963) und L a d n e r (1966), sowie auf Beobachtung von C a s t a n o - A l m e n d r a l , P a e s c h k e und von Z e z s c h w i t z (1967).

Ausgangspunkt ihrer Untersuchungen waren Beobachtungen bei Strahlenunfällen, bei denen eine vermehrte Ausscheidung von Proteinabbauprodukten im Urin nachgewiesen wurde. Bei ihren Tierversuchen arbeiteten sie mit subletalen und letalen Strahlendosen. Therapeutische Strahlendosen wurden Patientinnen verabreicht, bei denen bereits Veränderungen im Aminosäurespektrum durch das Tumorleiden vor Beginn der Bestrahlung vorlagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von intraperitoneal applizierter kolloidaler Radiogoldlösung untersucht. Die Menge des Radiogoldes entsprach der in der Therapie ange-

wandten üblichen Dosis von zwei mC^u pro kg Körpergewicht. Als Versuchstiere wurden dreizehn weibliche Kaninchen ausgewählt. Es wurde dabei der Frage nachgegangen, ob Konzentrationsänderungen im Aminosäurespektrum dieser Kaninchen nach Gabe von ¹⁹⁸Au zu erkennen sind und zu welchem Zeitpunkt diese Veränderungen hervortreten. Im Vordergrund der Betrachtungen stand die Frage, ob bei dieser Strahlendosis und Applikationsart vorübergehende oder bleibende Schäden für den Organismus zu erwarten sind.

Der Eiweißstoffwechsel nimmt im Organismus eine zentrale Stellung ein. Die Aufnahme des Eiweißes erfolgt im Magen-darmtrakt nach Aufspaltung in seine kleinsten Bausteine, den Peptiden und Aminosäuren, da, wie A b d e r h a l d e n (1913) zeigen konnte, die Resorption des vom Organismus aufgenommenen Eiweißes erst bei dieser Molekülgröße möglich ist. Die Konzentration der einzelnen aus dem Magendarmtrakt aufgenommenen Aminosäuren im Plasma und Gewebe ist niedrig und bewegt sich in Dimensionen von 10^{-1} $\mu\text{mol/l}$. Zu den resorbierten Aminosäuren gesellen sich im Blutplasma noch solche, die durch Abbau- und Umbauvorgänge im Organismus frei werden. R a p a p o r t (1962) bezeichnete die Summe der vorhandenen freien Aminosäuren im Blutserum, die aus der mit der Nahrung zugeführten und den im Organismus beim endogenen Ab- und Umbau des Körpereiwisses entstehenden Aminosäuren resultiert, als "labile Mischphase", wobei die Verweildauer der einzelnen Aminosäuren in dieser Phase sehr unterschiedlich ist. Der Transport ins Gewebe erfolgt durch Diffusion, wobei wahrscheinlich während dieses Vorganges eine Bindung an einen Trägerstoff (Carrier) erfolgt. H e i n z (1961) v a n S l y k e und M e i e r (1913) konnten zeigen, daß kurze Zeit nach intravenöser Gabe von Aminosäurelösung die Konzentration im Gewebe erheblich höher ist als im Blut, jedoch bereits nach 3 Stunden wieder normale Konzentrationswerte erreicht werden. Es erfolgte sowohl eine erhöhte Ausscheidung durch die Nieren als auch eine vermehrte Eiweißsynthese in der Zelle, um das Gleichgewicht zwischen Blut und Gewebe wieder herzustellen. Eine

Speicherung von Eiweißabbauprodukten in speziellen Depots ist im Gegensatz zu Fett und Kohlehydraten nicht möglich. Es kommt lediglich zu einer kurzfristigen intrazellulären Speicherung, insbesondere in den Zentren des Proteinstoffwechsels, also der Leber und Milz. Aufschluß darüber geben besonders Versuche mit Hilfe markierter Substanzen von S c h ö n h e i n e r (1946), sowie die Fütterungsversuche von L u c h (1932). Die Ausscheidung der Aminosäuren sowie der Endprodukte des Proteinstoffwechsels erfolgt durch die Nieren. Die freien Aminosäuren gelangen durch die Glomeruli in die Nierentubuli. Dort werden sie zu 97% rückresorbiert. (G . S t a l d e r , H . V e t t e r l i - B u c h n e r und H . B e r g e r 1960). Von den Drüsen mit innerer Sekretion haben besonders die Hypophyse und die Nebennierenrinde Einfluß auf die Auf- und Abbauvorgänge im Eiweißstoffwechsel. G o r d a n und Mitarbeiter (1948) konnten nach Verabreichung von Wachstumshormonen eine Abnahme der Aminosäurekonzentration im Blutplasma objektivieren. Die Zunahme des Eiweißgehaltes im Körper war erheblich. Der Einbau der Aminosäuren in die Muskulatur wurde nach Gabe dieser Hormone beschleunigt. Die Nebennierenrinde wirkt dagegen mit ihren Hormonen in entgegengesetzter Richtung. Das gleiche gilt auch für ACTH, das die Nebennierenrinde zu vermehrter Ausschüttung ihrer Hormone veranlasst. S o u p a r t (1960) fand eine Verminderung der Konzentrationen, die durch die hormonellen Einflüsse während des Zyklus bei Frauen in der Übergangsphase beim Eisprung auftreten. Nach Verabreichung proteinhaltiger Nahrung wird eine kurzdauernde Erhöhung des Aminosäurespiegels im Blut deutlich. Z i m m e r m a n n - T e l s c h o w (1965) und K r a u t (1962) erbrachten den Nachweis der Abhängigkeit der Konzentrationen von der Ernährung. Es sind also eine Vielzahl von Vorgängen endogener und exogener Art, die auf den Eiweißstoffwechsel Einfluß nehmen. Sie wurden, soweit möglich, bei dem vorliegenden Versuchsmaterial berücksichtigt.

Tabelle I

Kaninchen	Rasse	Gewicht	Alter	Geschlecht	Nahrung	Unverträglichkeit	Radiogoldgabe
I	Dt. Schwarzschecke	4 kg	2 J.	wbl.	Pressfutter (Hafer, Heu)	keine	8 mCG
II	"	4,2 "	2 "	"	"	"	8 mCG
III	Roter Neuseeländer	3,5 "	1 1/2 "	"	"	"	7 mCG
IV	"	3,6 "	1 1/2 "	"	"	"	7 mCG
V	"	3 "	1 "	"	"	"	6 mCG
VI	"	3,1 "	1 "	"	"	"	6 mCG
VII	"	3,25 "	1 "	"	"	"	6 mCG
VIII	" (nicht reinrassig)	3,5 "	1 1/2 "	"	"	"	7 mCG
IX	Roter Neuseeländer	3,6 "	1 1/2 "	"	"	"	7 mCG
X	"	3,42 "	1 1/2 "	"	"	Durchfall	7 mCG
XI	"	3,55 "	1 1/2 "	"	"	keine	7 mCG
XII	"	3,4 "	1 1/2 "	"	"	"	7 mCG
XIII	"	3,2 "	1 1/2 "	"	"	"	6 mCG

Versuchstiere

MATERIAL UND METHODE

Für die vorliegende Versuchsreihe waren dreizehn weibliche Kaninchen ausgewählt, die in Gewicht, Alter, Umweltbedingungen und Ernährung annähernd die gleichen Bedingungen erfüllten und so eine gute Ausgangsbasis bildeten. Das Gewicht bewegte sich zwischen 3,1 und 4,2 kg. Das Alter lag zwischen ein und zwei Jahren. Da Konzentrationsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren zu erwarten waren (O e p e n et O e p e n 1963) wurden diese geschlechtsspezifischen Unterschiede berücksichtigt und deshalb ausschließlich weibliche Kaninchen in diese Untersuchungsreihe einbezogen. Diese Tiere, rote Neuseeländer, deutsche Schwarzschecken, sowie nicht reinrassige rote Neuseeländer wurden im Tierstall unserer Klinik unter gleichen Bedingungen von Geburt an gehalten. Sie erhielten neben Grünfutter Hafer, Heu und Preßfutter. (Siehe Tabelle I) Vor der Radiogoldgabe wurde jedem Versuchstier drei ml Nativblut aus der Ohrarterie entnommen, um einen entsprechenden Ausgangswert zu ermitteln. Weitere Blutentnahmen erfolgten am zweiten, vierten, sechsten und zehnten Tag nach der Instillation bei jedem Versuchstier. Diese Zeiträume wurden gewählt, da auf Grund der bisherigen biochemischen und histopathologischen Kenntnisse diese Zeitintervalle optimal erschienen.

Das aus der Ohrarterie entnommene Nativblut wurde, nachdem die Spontangerinnung abgewartet worden war, bei 3000 U/min. zentrifugiert und das überstehende Serum vorsichtig abpipettiert. Nach Aufbewahrung der Seren in einer Tiefkühltruhe (maximal 40,0 Grad Celsius) erfolgte die Weiterverarbeitung dann spätestens nach 3 - 5 Tagen. Über die Veränderungen im Aminosäurespektrum durch Lagerung und Einfrieren liegen bereits zahlreiche Veröffentlichungen (S t e i n und von M o o r e (1954), O e p e n (1965), sowie Ergebnisse aus unserer Klinik (N i e d 1967) vor, sodaß auf weitere Untersuchungen bei dieser Versuchsreihe verzichtet werden konnte, da größere Verluste an freien Aminosäuren durch diese Vorgänge nicht zu erwarten waren. Instilliert wurde kolloidales ¹⁹⁸Au, bezogen von Radiochemical Centre Buckinghamshire (England), wobei der genaue Zeitpunkt

der Radiogold-Instillation berücksichtigt wurde. Das radioaktive ^{198}Au hat eine Halbwertszeit von 2,69 Tagen. Es emittiert sowohl eine starke Beta-Strahlung (Eindringtiefe nur 1-1,5 mm) als auch eine Gamma-Strahlung. Dabei zerfällt es in Hg^{168} . Der Anteil der Beta-Strahlung beträgt dabei etwa 90%. Der Abtransport erfolgt über die regionären Lymphbahnen, über Leber und Milz. Dort wird es abgefangen und gespeichert. Lediglich geringe Anteile der Radiogold-Instillation werden über Nieren und Darm ausgeschieden. Verdünnt wurde die gelieferte ^{198}Au -Lösung in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung und dann in die freie Bauchhöhle des Kaninchens appliziert. Der Nachlauf mit nochmals 5 ml physiologischer Kochsalzlösung und die im Anschluß daran vorgenommene Lagerung des Tieres sorgte für eine möglichst gleichmäßige Verteilung in der freien Bauchhöhle. Mit Hilfe der Ninhydrinreaktion lassen sich Aminosäuren sowohl quantitativ als auch qualitativ nachweisen. Zur Bestimmung der freien Aminosäuren im Serum wurde das von S t e i n und von M o o r e (1951) angegebene Verfahren benutzt, das von S p a c k m a n n und Mitarbeiter (1958), E a s t o e (1961) und K i r s t e n (1964) mehrfach verändert und verbessert wurde. Diese von S t e i n und M o o r e beschriebene Methode erschien für die vorliegende Arbeit, bei der achtzehn der wichtigsten im Organismus vorkommenden und für die Proteinsynthese erforderlichen Aminosäuren erfasst werden konnten, am geeignetesten. Die Trennung erfolgte mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie. Hierbei wurden die geringen Unterschiede in der Dissoziation der Amino- oder Karboxylgruppen ausgenutzt. Danach läßt man mit Hilfe des Ninhydrins eine Farbreaktion ablaufen, die dann kolorimetrisch aufgezeigt und ausgewertet wurde. Der Aminosäure-Autoanalyzer der Fa. Technicon GmbH besteht aus einem chromatographischen und einem analytischen System.

Chromatographisches System:

Auf eine 140 cm lange Säule (S), die einen Innendurchmesser von 6 mm hat und mit mikroporäischem Chromobeadharz Typ A

(Fa.Technicon) gefüllt ist, wird zu Beginn der Analyse aufbereitetes Serum gegeben. Ein Glasmantel, der die Säule umschließt und durch ~~den~~ Wasser von + 65 Grad Celsius kontinuierlich gepumpt wird, garantiert eine konstante Innentemperatur (T).

Vorgeschaltet ist ein automatisches Puffer-Mischgerät (Autograd), von dem über eine Mikrohochdruckpumpe 0,5 ml/min. Citratpuffer gleichmäßig auf die Säule gepumpt wird. Der pH-Wert des Citratpuffers variiert dabei von pH 2,875 bis pH 5,0. Ein Rührwerk sorgt für eine gleichmäßige Verteilung in dem Autograd.

Analytisches System:

Das Eluat aus der Säule wird über eine Proportionierungspumpe (PP) gegeben und in einem Verhältnis von 1:23 mit dem Ninhydrinreagens und O₂-freiem Stickstoff gleichmäßig vermischt. Das Gemisch läuft von den Schläuchen der Proportionierungspumpe in ein Heizbad (HB), in dem nun die Ninhydrin-Reaktion bei 100 Grad Celsius abläuft. Hier kommt es zu einer Farbentwicklung, deren Intensität von der Konzentration der im Eluat befindlichen Aminosäuren abhängig ist.

In drei Photometern (P) werden diese Farbreaktionen gemessen.

Schichtdicke		Wellenlänge
1	15 mm	440 m/ μ
2	8 mm	570 m/ μ
3	15 mm	570 m/ μ

Sämtliche Aminosäuren, außer Prolin, ergeben eine blauviolette Verfärbung. Ihr Extinktionsmaximum liegt bei 578 m/ μ . Die Messung erfolgte mit den Photometern 2 und 3. Das Photometer 1 registrierte Prolin, das eine gelbe Farbreaktion zeigte und dessen Extinktionsgipfel bei 436 m/ μ liegt.

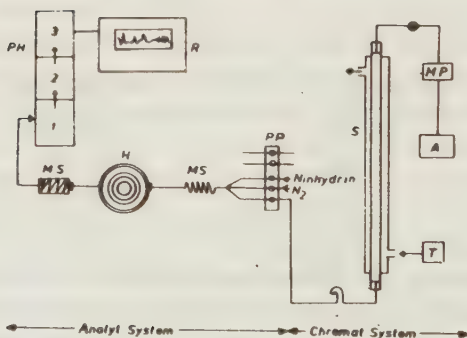
Reagenzien und ihre Zubereitung:

Aminosäurentestlösung:

Von den Aminosäuren DL Alanin, L (+) Arginin, L (-) Asparaginsäure, L (-) Cystin, L (+) Glutaminsäure, Glycocoll, L (+) Isoleucin, L Leucin, L (+) Lysin, DL Methionin, Phenylalanin, L (-) Prolin, DL Serin, SL Threonin, L (-) Tyrosin, DL Valin wurde eine Lösung hergestellt, in der die einzelne Aminosäure eine Molarität von $0,1 \mu\text{mol}$ hatte. *) Alle obengenannten Aminosäuren wurden mit einer Cahn-Waage **) eingewogen und in $0,1 \text{ nHCl}$ gelöst. Portionen von $2,5 \text{ ml}$ wurden in Ampullen gefriergetrocknet, eingeschmolzen **) und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

*) Cahn-Instr. Comp., Paramount, California, USA

**) Texvac IIA, Textor, Bad Soden (Taunus)



Skizze der Apparatur

nach: Analyt. Chem. Vol. 36/ S. 1146-8 (1954)

Citratpuffer

	pH 2,875	pH 3,80	pH 5,00
Na- Citrat 2 H ₂	14,71 g	14,71 g	14,71 g
Aq dest	900 ml	900 ml	900 ml
2 n NaOH	25 ml	25 ml	25 ml
Brij. 35	10 ml	10 ml	10 ml
Thiodiglycol	5 ml	5 ml	-
NaCl	-	-	35,07 g

Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgt durch Titration mit 6 nHCl am Beckman-pH-Meter Typ Research^{*)}. Um eine Erhöhung der Flußgeschwindigkeit ohne Verbreiterung der registrierten Amonisäuregipfel (T u r b a 1955) zu erreichen, wurde Brij. 35 (d.h. Polyaethylenglycol-aether) zugesetzt. Thiodiglycol, das einen Verlust von Methionin (T u r b a 1955) verhindern soll, wurde außerdem in der angegebenen Konzentration der Lösung zugefügt. Der Autograd, der eine gleichmäßige Mischung der Puffer garantieren soll, besteht aus 9 Kammern, die wie umseitig beschrieben, gefüllt sind:

*) Beckman Instruments GmbH., 8 München 45, Frankfurter Ring 115

Kammer	Puffer:	pH 2,875	pH 3,80	pH 5,00
1		70 ml + 5 ml Methanol	-	-
2		72 ml + 3 ml Methanol	-	-
3		75 ml	-	-
4		75 ml	-	-
5		-	70 ml	5 ml
6		6 ml	9 ml	60 ml
7		-	-	75 ml
8		-	-	75 ml
9		-	-	75 ml

Ninhydrinreagens (S t e i n und M o o r e 1954)

20 g Ninhydrin
 1,5 g Hydrindantin
 650 ml Äthylenglycolmonomethyläther (Methylcellusolve)
 350 ml 4 n Na-Acetatpuffer

Sowohl Ninhydrin als auch Hydrindantin werden in einen schwarzen Erlenmeierkolben gegeben und in Methylcellusolve gelöst. Danach wird 15 Minuten lang reiner Stickstoff durch die Lösung geleitet und Acetatpuffer hinzugegeben. Das ganze Gemisch wird 30 Minuten lang mit Stickstoff durchperlt und dann 500 ml dieses Gemisches mit 1,500 ml Methylcellusolve vermischt. Methylcellusolve wird mit Wasser 1 : 1 vorher verdünnt. Um das ganze Gemisch möglichst O₂-arm zu erhalten, wird vor Beginn einer jeden Analyse nochmals Stickstoff durch die Lösung gegeben.

Acetatpuffer

1640 g Na-Acetat
 500 ml Eisessig
 5 ml Aqua dest

Natriumacetat gibt man vorsichtig nach und nach in ein mit etwa 3 l Aqua dest gefülltes Recherglas und bringt die Kristalle in Lösung. Gelegentlich müssen durch Erwärmung die Kristalle erst

in Lösung gebracht werden. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird Eisessig der Lösung zugegeben und das Gemisch auf 5 l aufgefüllt. Der pH-Wert beträgt $5,5 \pm 0,03$, um eine konstante Farbqualität des Ninhydrinreagens zu garantieren. Eine Korrektur des pH-Wertes wurde mit NaOH ausgeführt.

(5 g entsprechen einer Änderung von 0,04 pH-Einheiten)

Aufbereitung der Seren:

Um eine einwandfreie chromatographische Trennung der freien Aminosäuren im Blutserum zu erhalten, war es nötig, die Serumproteine zu entfernen. Hierzu schien ein von C r a f t (1965) angegebenes Verfahren am geeignetesten. Es wurde in unserer Klinik schon mehrfach erprobt und wurde im Vergleich zu den bisherigen Verfahren als das schonendste angesehen. Bei diesem Verfahren kommt es im Gegensatz zu den bisherigen Fällungsmethoden mit 1%iger Pikrinsäure, 15 - 20%iger Trichloressigsäure oder 0,5%iger Essigsäure lediglich zur Bindung der freien Aminosäuren an das Austauschharz, während die Proteinbestandteile dann mit dem Überstand entfernt werden.

Harzaufbereitung:

Aufgeschlemmtes Austauscherharz (Chromobeadharz Typ A der Fa. Technicon GmbH) in der Kationenform wird in einem Zentrifugengläschen bei 3.000 U/min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und zu dem Bodensatz 1 ml 0,1 nHCl gegeben. Nach kräftigem Schütteln wird erneut zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und zu diesem Bodensatz 1 ml Serum und 1 ml 0,1 μ mol Norleucinlösung (s.u. Interner Standard) gegeben. Die Suspension wird vorsichtig bei Raumtemperatur 1 Stunde geschüttelt, danach erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun gibt man nochmals 2 ml 0,1 nHCl zu dem Bodensatz. Es wird erneut vorsichtig geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Zugabe von wiederum 2 ml 0,1 nHCl ist das nun von Proteinbestandteilen freie Harz für die Analyse fertig und wird mit einer Pasteurpipette auf die Harzsäule gegeben.

Das Zentrifugengläschen wird danach vorsichtig mit Citratpuffer (pH 2,875) nachgespült und der Harzsäule aufgegeben. Schließlich, nachdem sich das aufgegebene Harz abgesetzt hat, wird die Säule mit dem Puffer von pH 2,875 aufgefüllt und luftdicht verschlossen.

Regeneration der Säule:

Die Analysendauer beträgt 21 Stunden. Anschließend wird das chromatographische System regeneriert und das System gesäubert. 30 Min. lang wird 0,2n NaOH und 90 Min. lang Citratpuffer mit einem pH von 2,875 durch das chromatographische System gepumpt. Das analytische System wird gesäubert und gereinigt, indem man 10 Min. lang Aqua dest, 30 Min. lang Haemosol (R) (0,4 g/l), 5 Min. lang Aqua dest, 20 Min. lang 0,5n NaOH und schließlich 20 Min. lang Aqua dest gleichmäßig über die Proportionierungspumpe durch das System geleitet wird. Danach ist sowohl das chromatographische als auch das analytische System der Apparatur für die nächste Analyse bereit.

Externer Standard:

Da der Analysenvorgang einen Zeitraum von 21 Stunden einnimmt, können zahlreiche Faktoren diesen Vorgang beeinflussen. Um diese Tatsache zu berücksichtigen, wurde zu Beginn und am Ende eines jeden Analysenvorganges eine 0,1 μ mol Norleutininlösung durch das analytische System gegeben, die Extinktionswerte miteinander verglichen und bei der Berechnung der absoluten Konzentrationswerte entsprechend berücksichtigt. Als hauptsächliche Störfaktoren sind die Änderungen der Ninhydrinreagenzqualität sowie die Abnutzungserscheinungen der Schläuche der Proportionierungspumpe während des Vorganges anzusehen.

Interner Standard:

Zu Beginn jeder Analyse wurde der Serumprobe eine Aminosäure zugesetzt, die in dem zu untersuchenden Aminosäurespektrum nicht vorkommt und etwa in der Mitte des Analysenvorgangs

erscheint. Dadurch konnten Faktoren berücksichtigt werden, die auf den Arbeitsvorgang (Serumaufbereitung, Elutions- und Analysenvorgang) Einfluß nehmen. Benutzt wurde eine von der Fa. Technicon GmbH., Frankfurt empfohlene und hergestellte Norleucinlösung, die in einer 2,5 μ mol-Konzentration geliefert wurde. Die Herstellung einer 0,05 μ mol-Lösung erfolgte dann mit 0,1 nHCl.

ERGEBNISSE

Chromatogramme und ihre Auswertung:

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode konnten folgende Aminosäuren aus dem Serum eluiert und in nachstehender Reihenfolge registriert werden:

Reihen- folge	Amino- säuren	Abkürzung	Zeitp.des Auftretens in Std.
1.	Asparaginsäure	Asp.	2,75 (Mittelwerte
2.	Threonin	Thre.	3,0 der Serum-
3.	Serin	Ser.	3,0 Proben)
4.	Glutaminsäure	Glu.	3,5
5.	Prolin	Pro.	3,75
6.	Glycin	Gly.	4,5
7.	Alanin	Ala	4,75
8.	Valin	Val.	6,0
9.	Cystin	Cys.	7,5
10.	Methionin	Meth.	8,5
11.	Isoleucin	Isoleu.	9,0
12.	Leucin	Leu.	9,5
13.	Norleucin	Norleu.	10,0 (int.Standard)
14.	Tyrosin	Tyr.	10,5
15.	Phenylalanin	Phe.	10,75
(16.	Ammoniak)	Amm.	11,0
17.	Lysin	Lys.	13,5
18.	Histidin	Hist.	14,0
19.	Glycilmethylester ²	Glyc.Meth.E.	15,0
20.	Arginin	Arg.	18,5

Berechnung der Kurvenflächen

Die Aminosäuren werden bei einem exakten Analysenvorgang als Aminosäuregipfel im Sinne einer Gauß'schen Verteilungskurve registriert. Die Aufzeichnung erfolgte durch einen Punktschreiber auf halbblogarrhythmisch eingestelltem Registrierpapier. Die Berechnung der Kurvenfläche wurde nach einer von W. H o l y (aus

dem Handbuch "Technicon" entwickelten Formel

$$f = 1/2 \text{ o.D.} \times n \quad \begin{array}{l} \text{o.D.} = \text{Extinktion} \\ n = \text{Anzahl der Punkte} \\ \text{oberhalb } 1/2 \text{ o.D.} \end{array}$$

vorgenommen.

Testchromatogramme

Um die Aminosäurekonzentration zu berechnen, wurde eine Eichlösung verwendet, in der jede Aminosäure in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ vorliegt. Die Auswertung des Serumchromatogrammes erfolgte im Vergleich zu jeder Fläche der in diesem Chromatogramm erscheinenden Aminosäuren. Die Reihenfolge der einzelnen Aminosäuren im Chromatogramm und eine etwaige Differenz zwischen dem zu Beginn und Ende eines jeden Elutionsvorganges gewonnenen Wertes (s. Externer Standard) wurde stets berücksichtigt. Danach konnte die Berechnung des Serumchromatogrammes unter Berücksichtigung des gewonnenen Norleucin-Aequivalentwertes erfolgen. So wurden jeweils die absoluten Konzentrationswerte, gemessen in einer Dimension von $10^{-1} \mu\text{mol/ml}$ Serum, ermittelt. Um die Fehlerbreite dieser Methode zu erfassen, wurden zu Beginn, während und nach den Versuchsreihen mit dreizehn weiblichen Kaninchen vier Eichchromatogramme hergestellt. Die mittlere Abweichung vom Mittelwert aus den vier vorliegenden Testchromatogrammen ist aus dem nachfolgenden Diagramm ersichtlich.

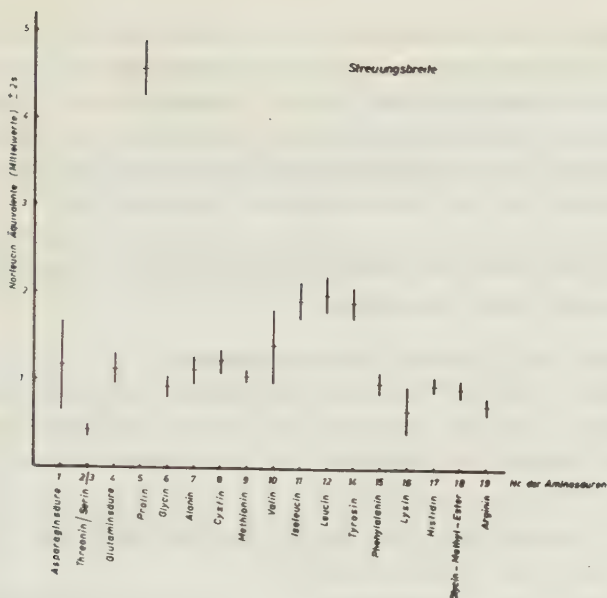
Die Ausrechnung wurde nach folgender Formel vorgenommen:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{n - 1}}$$

s	= Standardabweichung
$\sum_{i=1}^n x^2$	= Summe von $x_1^2 - x_n^2$
$\bar{x}$	= Mittelwert
$\sum_{i=1}^n x$	= Summe der Einzelwerte
n	= Anzahl der Ergebnisse

Diagramm I

Berechnet wurde die Streubreite für jede Aminosäure. Auf der Abzisse erscheinen die Aminosäuren, auf der Ordinate Mittelwert und Streuung.



Vorliegendes Diagramm zeigt Mittelwerte und deren mittlere Abweichung (gemessen in Norleucin-Äquivalenten) für jede einzelne Aminosäure der während der Versuchsreihe angefertigten Test-Chromatogramme. Bei fünfzehn aufgezeigten und registrierten Aminosäuren bewegte sich die Fehlerbreite im Normbereich. Lediglich Asparaginsäure, Prolin und Valin zeigen größere Abweichungen vom Mittelwert. Asparaginsäure konnte nur ungenau bei dieser Methode getrennt werden, so daß sich diese Abweichungen durch eine ungenügende Auftrennung erklären läßt. Die stärkere Abweichung von Prolin beruhte auf einem technischen Fehler im automatischen Registriergerät, der jedoch am Ende der Versuchsserie erkannt wurde. Für die stärkere Streuung vom Mittelwert bei Valin fand sich keine Erklärung.

Wie aus der Literatur bekannt, geben einige Autoren (Glendning, Margolis 1961; Knauff, Seybold und Miller 1964) die auf den Chroma-

togrammen erscheinenden ersten drei Aminosäuren (Asparaginsäure, Threonin und Serin) nur in Summen an, da sie bei ihren Arbeitsvorgängen eine exakte Trennung nicht erzielen konnten. Hervorgerufen wird diese nicht ganz vollkommene Auftrennung durch anorganische Salze und andere störende Bestandteile der zu untersuchenden Flüssigkeiten.

C o n s d e n , G o r d o n u n d M a r t i n (1947) haben durch Entsalzung der zu untersuchenden Flüssigkeiten den Nachweis dafür erbracht.

Ergebnisse von 65 Serum-Chromatogrammen:

Von dreizehn weiblichen Kaninchen wurden vor Gabe von 198^{AU} am zweiten, vierten, sechsten und zehnten Tag nach Gabe je einer Serumprobe entnommen und die Konzentration bestimmt.

Signifikanzberechnung für Paardifferenzen nach dem Wilcoxon-Test (G e i g y 1963): Tabelle V

Darstellung der Veränderungen der einzelnen Aminosäuren nach Radiogoldgabe:

Eine statistisch signifikante Veränderung nach Gabe von Radiogold wurde dann angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag. Die Verminderung freier Aminosäuren am zweiten Tag nach Radiogoldgabe konnte statistisch mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nicht gesichert werden; dagegen war bei dem Vergleich der Werte vom ersten zum vierten Tag eine statistische Signifikanz bei den meisten Aminosäuren vorhanden. Die Aminosäurekonzentration war zu diesem Zeitpunkt erheblich höher als vor der Radiogoldgabe. Noch deutlicher traten diese Veränderungen zwischen dem zweiten und vierten Tag hervor. Auch der Abfall vom vierten zum sechsten Tag lässt sich bei fast allen Aminosäuren statistisch beweisen (siehe Tabelle V).

Jede einzelne Aminosäure ist nachfolgend in Diagrammen aufgezeigt, die Mittelwerte und deren mittlere Abweichung an dem jeweiligen Entnahmetag aufgetragen. Der Mittelwert wurde jeweils von dreizehn Serumproben berechnet, der Wert vor der Gabe gleich 100% gesetzt und die nachfolgenden Werte an den jeweiligen Entnahmetagen zu diesem in Relation gesetzt.

Tabelle II

Aminosäure	I	II	III	IV	$\bar{x}$	+ 2 S	- 2 S
Asparagins.	1,083	0,911	1,209	1,481	1,171	1,651	0,690
Thr./Ser.	0,385	0,418	0,453	0,438	0,423	0,482	0,364
Glu.S.	1,064	1,099	1,256	1,096	1,128	1,301	0,956
Prolin	4,737	4,482	4,643	4,397	4,564	4,871	4,257
Glycin	0,922	0,840	0,987	0,914	0,915	1,036	0,795
Alanin	1,089	1,022	1,209	1,128	1,112	1,268	0,955
Cystin	1,198	1,143	1,289	1,222	1,213	1,334	1,091
Meth.	1,031	1,018	1,091	1,053	1,048	1,112	0,984
Val.	1,363	1,675	1,367	1,172	1,394	1,810	0,978
Isoleu.	1,826	1,961	1,826	2,037	1,912	2,121	1,703
Leucin	2,127	1,968	1,870	2,020	1,996	2,210	1,782
Tyrosin	1,941	2,015	1,831	1,828	1,903	2,085	1,721
Phenylal.	0,899	1,027	1,032	0,978	0,984	1,107	0,860
Lysin	0,509	0,643	0,712	0,830	0,673	0,941	0,405
Histidin	1,000	0,983	0,985	0,909	0,969	1,051	0,887
Gly.Meth.E.:	0,970	0,939	0,914	0,856	0,919	1,063	0,823
Arg.	0,781	0,757	0,710	0,678	0,731	0,824	0,638

Ermittlung der Fehlerbreite

Werte, angegeben in Norleucin - Äquivalenten von 4 Testchromatogrammen. Mittelwert und mittlere Abweichung vom Mittelwert.

Tabelle III

Versuchstier	Entnahme-tag	Aps.	Thre/ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Meth.	Val.
I	0.	0,146	0,277	0,614	0,461	1,875	0,620	0,242	0,056	0,077
	2.	0,135	0,472	0,423	0,597	2,456	0,727	0,372	0,050	0,119
	4.	0,173	0,253	0,682	0,486	2,220	0,661	0,320	0,070	0,054
	6.	0,086	0,384	0,310	0,633	1,820	0,675	0,384	0,079	0,089
	10.	0,147	0,037	0,616	0,252	1,602	0,545	0,267	0,087	0,078
II	0.	0,146	0,199	0,703	0,584	1,496	0,803	0,413	0,080	0,050
	2.	0,105	0,587	0,504	0,736	2,266	0,625	0,497	0,119	0,045
	4.	0,207	0,803	0,536	2,999	6,309	1,637	0,887	0,152	0,020
	6.	0,073	0,262	0,225	4,975	1,213	0,611	0,286	0,081	0,041
	10.	0,070	0,435	0,212	0,548	1,750	0,803	0,344	0,092	0,038
III	0.	0,090	0,268	0,300	0,535	1,872	0,576	0,324	0,063	0,025
	2.	0,089	0,251	0,302	0,512	1,487	0,518	0,339	0,096	0,033
	4.	0,170	0,192	0,637	0,407	0,967	0,666	0,384	0,093	0,222
	6.	0,078	0,275	0,284	0,439	0,176	0,681	0,364	0,089	0,045
	10.	0,070	0,294	0,172	0,538	1,928	0,483	0,463	0,151	0,050

Freie Aminosäuren im Kaninchenserum

Werte (10^{-1} /umol/ml) von dreizehn Fällen, gemessen vor Inst., am 2., 4., 6. und 10. Tag nach der Instillation

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Ileu	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Gly/M/E:	Arg
I	0.	0,243	0,391	0,312	0,138	0,214	0,327	0,186	0,200
	2.	0,311	0,401	0,353	0,172	0,281	0,499	0,077	0,029
	4.	0,311	0,307	0,342	0,063	0,802	0,338	0,427	0,398
	6.	0,251	0,395	0,363	0,137	0,199	0,344	0,126	0,354
	10.	0,323	0,297	0,285	0,133	0,208	0,342	0,152	0,343
II	0.	0,309	0,473	0,330	0,141	0,194	0,478	0,333	0,416
	2.	0,315	0,575	0,483	0,157	0,244	0,620	0,167	0,636
	4.	0,681	1,013	0,547	0,143	0,338	2,011	0,417	0,863
	6.	0,199	0,343	0,366	2,968	0,155	0,347	0,251	0,318
	10.	0,276	0,428	0,422	0,199	0,136	0,429	0,297	0,391
III	0.	0,239	0,322	0,328	0,100	0,142	0,460	0,292	0,350
	2.	0,235	0,380	0,380	0,130	0,137	0,439	0,308	0,336
	4.	0,272	0,404	0,365	0,140	0,161	0,507	0,308	0,381
	6.	0,251	0,347	0,339	0,111	0,155	0,495	0,311	0,362
	10.	0,412	0,652	0,527	0,164	0,311	1,102	0,429	0,479

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Aps.	Thre/Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Meth.	Val.
IV	0.	0,109	0,233	0,484	0,504	1,533	0,532	0,408	0,097	0,044
	2.	0,084	0,327	0,300	0,432	1,602	0,423	0,381	0,103	0,046
	4.	0,106	0,296	0,576	0,805	2,257	0,557	0,289	0,095	0,043
	6.	0,056	0,176	0,227	0,364	1,087	0,334	0,252	0,065	0,023
	10.	0,110	0,250	0,445	0,481	2,349	0,806	0,504	0,120	0,058
V	0.	0,099	0,371	0,418	0,604	2,289	0,948	0,400	0,083	0,035
	2.	0,085	0,419	0,574	1,590	3,192	1,237	0,369	0,078	0,036
	4.	0,504	1,083	1,995	5,237	6,592	2,444	0,852	0,002	-----
	6.	0,132	0,308	0,903	0,768	2,176	1,184	0,503	0,102	0,039
	10.	0,091	0,342	0,275	0,948	2,301	1,160	0,291	0,047	0,021
VI	0.	0,131	0,346	0,592	0,593	1,767	0,579	0,434	0,093	0,040
	2.	0,108	0,374	0,354	0,365	0,926	1,039	0,413	0,141	0,005
	4.	0,169	0,589	0,578	1,302	2,736	0,874	0,708	0,094	0,005+
	6.	0,080	0,094	0,272	0,275	1,267	0,306	0,161	0,068	0,042
	10.	0,068	0,122	0,299	0,328	0,977	0,569	0,345	0,084	0,038

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchstier	Entnahmetag	Ileu	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Gly/M/E:	Arg
IV	0.	0,271	0,411	0,270	0,136	0,164	0,430	0,236	0,455
	2.	0,264	0,394	0,530	0,129	0,174	0,299	0,214	0,320
	4.	0,214	0,362	0,411	0,167	0,154	0,206	0,347	0,302
	6.	0,154	0,252	0,177	0,064	0,118	0,246	0,145	0,189
	10.	0,359	0,502	0,394	0,148	0,162	0,460	0,320	0,285
V	0.	0,271	0,464	0,438	0,123	0,169	0,457	0,426	0,437
	2.	0,206	0,338	0,341	0,098	0,168	0,547	0,367	0,433
	4.	0,425	0,883	0,640	0,090	0,535	1,398	0,608	0,484
	6.	0,383	0,507	0,506	0,132	0,226	0,763	0,447	0,600
	10.	0,115	0,193	0,322	0,071	0,165	0,307	0,237	0,274
VI	0.	0,270	0,429	0,333	0,143	0,192	0,486	0,365	0,468
	2.	0,245	0,656	0,244	0,752	0,031	0,900	0,424	0,494
	4.	0,373	0,768	0,512	0,161	0,232	0,544	0,454	0,521
	6.	0,166	0,328	0,316	2,349	0,182	0,315	0,204	0,298
	10.	0,187	0,205	0,244	2,506	0,106	0,208	0,180	0,292

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Aps.	Thre/Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Meth.	Val.
VII	0.	0,150	0,205	0,648	0,905	1,956	0,952	0,564	0,134	0,042
	2.	0,110	0,247	0,433	0,470	1,801	0,649	0,302	0,104	0,045
	4.	0,111	0,244	0,245	0,588	1,790	0,739	0,406	0,089	0,056
	6.	0,045	0,120	0,095	0,189	0,815	0,333	0,158	0,026	0,049
	10.	0,055	0,191	0,236	0,516	1,159	0,777	0,987	0,111	0,073
VIII	0.	0,239	0,382	0,107	0,657	2,597	0,912	0,500	0,136	0,048
	2.	0,097	0,444	0,064	1,175	3,819	0,806	0,426	0,075	0,032
	4.	0,250	0,552	0,864	1,063	3,451	1,166	0,485	0,092	0,009
	6.	0,144	0,700	0,427	3,691	6,909	1,815	0,567	0,125	-----
	10.	0,222	0,714	0,749	0,361	5,139	1,099	0,578	0,070	-----
IX	0.	0,136	0,436	0,512	0,824	2,264	1,009	0,550	0,097	0,027
	2.	0,071	0,397	0,448	0,923	2,351	1,089	0,377	0,045	0,078
	4.	0,155	0,327	0,881	1,142	2,867	1,410	0,523	0,123	0,055
	6.	0,070	0,340	0,324	0,745	1,749	0,782	0,382	0,097	0,034
	10.	0,071	0,319	0,315	0,688	1,428	0,688	0,305	0,081	0,221

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Ileu	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Gly/M/E:	Arg
VII	0.	0,417	0,674	0,471	0,184	0,389	0,573	0,318	0,633
	2.	0,261	0,317	0,299	0,110	0,149	0,396	0,283	0,364
	4.	0,267	0,366	0,423	0,123	0,179	0,434	0,235	0,470
	6.	0,034	0,133	0,212	0,060	0,080	0,256	0,175	0,242
	10.	0,209	0,332	0,459	0,152	0,155	0,289	0,246	0,366
VIII	0.	0,404	0,558	0,436	0,175	0,293	0,833	0,316	0,624
	2.	0,130	0,368	0,539	0,125	0,192	0,498	0,332	0,463
	4.	0,376	0,606	0,617	0,180	0,441	0,597	0,379	0,384
	6.	0,297	0,618	0,399	0,102	0,292	1,380	0,270	0,656
	10.	0,288	0,638	0,319	0,134	0,273	0,984	0,458	0,420
IX	0.	0,339	0,633	1,785	0,105	0,550	0,427	0,134	0,805
	2.	0,584	-----	0,417	0,102	0,020	0,775	0,026	0,362
	4.	0,471	0,673	0,130	1,139	0,642	0,488	0,130	0,680
	6.	0,291	0,430	1,137	-----	0,319	0,312	0,122	0,369
	10.	0,274	0,389	0,954	-----	0,271	0,312	0,164	0,416

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Aps.	Thre/Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Meth.	Val.
X	0.	0,119	0,364	0,452	0,693	2,825	1,206	0,570	0,103	-----
	2.	0,168	0,330	1,009	0,766	1,819	1,302	0,655	0,125	0,023
	4.	0,162	0,509	0,588	0,558	2,135	1,476	1,003	0,208	-----
	6.	0,108	0,313	0,366	0,591	1,628	0,906	0,285	0,074	-----
	10.	0,117	0,294	0,545	0,624	1,716	0,917	0,481	0,137	0,020
XI	0.	0,143	0,204	0,400	0,496	2,232	0,725	0,334	0,039	-----
	2.	0,101	0,504	0,344	1,495	2,714	0,609	0,346	0,098	-----
	4.	0,177	1,631	0,546	1,749	4,579	2,035	1,640	0,341	-----
	6.	0,154	0,468	0,458	0,655	2,308	2,526	0,237	0,032	-----
	10.	0,084	0,424	0,223	0,547	1,758	0,467	0,400	0,132	-----
XII	0.	0,110	0,326	0,330	3,944	2,050	0,810	0,596	0,135	0,032
	2.	0,209	0,646	0,495	3,494	7,061	2,343	0,542	0,048	0,007
	4.	0,170	0,401	0,717	1,373	3,707	1,077	0,621	0,142	0,039
	6.	0,200	0,504	0,326	2,285	7,588	1,296	0,405	0,038	0,027
	10.	0,194	0,798	0,454	1,197	5,164	2,365	0,909	0,135	-----

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Ileu	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Gly/M/E:	Arg
X	0.	0,340	0,629	0,350	0,020	0,282	0,759	0,430	0,380
	2.	0,522	0,785	0,442	0,097	0,183	0,466	0,388	0,432
	4.	0,649	1,051	0,345	0,033	0,398	1,057	0,432	0,646
	6.	0,172	0,425	0,283	0,058	0,232	0,665	-----	-----
	10.	0,366	0,447	-----	0,581	0,464	0,291	0,096	0,520
XI	0.	0,375	0,411	0,293	0,130	0,028	0,314	0,253	0,241
	2.	0,215	0,430	1,182	0,100	0,276	0,276	0,147	0,344
	4.	1,036	1,639	2,525	0,079	1,495	0,908	0,171	1,448
	6.	0,274	0,319	0,162	0,681	0,127	0,250	0,061	0,231
	10.	0,335	0,466	1,567	0,099	0,218	0,266	0,132	0,353
XII	0.	0,376	0,623	0,386	0,137	0,151	0,672	0,203	0,456
	2.	0,225	0,442	0,354	0,091	0,264	0,797	0,355	0,545
	4.	0,444	0,985	0,501	0,200	0,283	0,838	0,407	-----
	6.	0,249	3,976	0,287	0,095	0,312	0,988	0,288	0,426
	10.	0,641	1,044	0,688	0,989	0,988	0,478	0,088	0,923

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- tag	Aps.	Thre/Ser.	Glu.	Pro.	Gly.	Ala.	Cys.	Meth.	Val.
XIII	0.	0,144	0,440	0,429	0,696	2,882	1,404	0,646	0,138	0,045
	2.	0,105	0,216	0,271	0,609	1,803	0,548	0,357	0,077	0,038
	4.	0,128	0,258	0,423	0,727	1,799	0,887	0,611	0,163	0,047
	6.	0,091	0,345	0,197	0,477	3,137	0,789	0,332	0,057	0,021
	10.	0,116	0,394	0,209	1,003	2,539	0,961	0,564	0,161	0,035

Tabelle III (Fortsetzung)

Versuchs- tier	Entnahme- Tag	Ileu	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Gly/M/E:	Arg
XIII	0.	0,482	0,681	0,541	0,146	0,239	0,785	0,324	0,596
	2.	0,224	0,350	0,307	0,124	0,133	0,326	0,225	0,329
	4.	0,505	0,761	0,502	0,157	0,182	0,825	0,297	0,627
	6.	0,192	0,281	0,234	0,078	0,107	0,456	0,217	0,393
	10.	0,352	0,555	0,242	0,112	0,203	0,665	0,306	0,533

Tabelle IV

Aminosäure	Inst.Tag 0	2.Tag	4.Tag	6.Tag	10.Tag
+ 2 s	0,209	0,188	0,393	0,190	0,211
$\bar{x}$ -	0,135	0,112	0,190	0,101	0,108
- 2 s	0,061	0,037	-	0,012	0,006
Asparag. säure					
+ 2 s	0,484	0,661	1,376	0,657	0,779
$\bar{x}$ -	0,311	0,401	0,549	0,329	0,354
- 2 s	0,138	0,140	-	0,002	-
Thre./ Ser.					
+ 2 s	0,784	0,861	1,552	0,728	0,729
$\bar{x}$ -	0,460	0,424	0,712	0,339	0,366
- 2 s	0,136	-	-	-	0,002
Glut.S.					
+ 2 s	0,897	2,699	4,100	4,219	1,173
$\bar{x}$ -	0,629	1,012	1,418	1,237	0,617
- 2 s	0,361	-	-	-	0,061
Prolin					

Mittelwerte ($\bar{x}$) und ± 2 Standardabweichungen ($\pm 2 s$) vom Mittelwert für jede Aminosäure am jeweiligen Entnahmetag.

Tabelle IV (Fortsetzung)

Aminosäure	Inst.Tag O	2.Tag	4.Tag	6.Tag	10.Tag
Glycin	+ 2 s 3,016	5,662	6,631	6,962	4,982
	$\bar{x}$ - 2,126	2,561	3,185	2,451	2,293
	- 2 s 1,235	-	-	-	-
Alanin	+ 2 s 1,369	1,944	2,353	1,654	1,884
	$\bar{x}$ - 0,852	0,916	1,202	0,787	0,895
	- 2 s 0,334	-	0,050	-	-
Cystin	+ 2 s 0,702	0,608	1,405	0,573	0,946
	$\bar{x}$ - 0,460	0,413	0,671	0,332	0,494
	- 2 s 0,217	0,218	-	0,090	0,042
Meth.	+ 2 s 0,161	0,149	0,290	0,129	0,176
	$\bar{x}$ - 0,096	0,089	0,128	0,071	0,108
	- 2 s 0,031	0,028	-	0,014	0,039

Tabelle IV (Fortsetzung)

Aminosäure		Inst. Tag 0	2. Tag	4. Tag	6. Tag	10. Tag
Val.	+ 2 s	0,070	0,103	0,178	0,079	0,180
	$\bar{x}$ -	0,042	0,042	0,055	0,041	0,063
	- 2 s	0,013	0,019	0,068	0,002	-
Isoleu	+ 2 s	0,483	0,546	0,906	0,395	0,572
	$\bar{x}$ -	0,333	0,295	0,463	0,224	0,318
	- 2 s	0,183	0,043	0,020	0,052	0,064
Leucin	+ 2 s	0,759	0,740	1,499	2,659	0,921
	$\bar{x}$ -	0,515	0,453	0,755	0,642	0,472
	- 2 s	0,270	0,165	0,010	-	0,024
Tyrosin	+ 2 s	0,536	0,925	1,789	0,867	1,304
	$\bar{x}$ -	0,374	0,451	0,604	0,367	0,534
	- 2 s	0,211	-	-	-	-

Tabelle IV (Fortsetzung)

Aminosäure		Inst. Tag 0	2. Tag	4. Tag	6. Tag	10. Tag
Phenylal.	+ 2 s	0,209	0,522	0,775	2,567	1,847
	$\bar{x}$	0,129	0,168	0,205	0,569	0,440
	- 2 s	0,048	-	-	-	-
L. sin	+ 2 s	0,489	0,339	1,194	0,351	0,749
	$\bar{x}$	0,231	0,173	0,449	0,192	0,287
	- 2 s	-	0,006	-	0,033	-
Histidin	+ 2 s	0,882	0,921	1,762	1,209	1,036
	$\bar{x}$	0,538	0,526	0,780	0,524	0,467
	- 2 s	0,194	0,130	-	-	-
Gly. Meth. Ester!	+ 2 s	0,471	0,502	0,610	0,426	0,476
	$\bar{x}$	0,293	0,254	0,354	0,218	0,238
	- 2 s	0,115	0,006	0,098	0,009	0,000

Tabelle IV (Fortsetzung)

Aminosäure	Inst.Tag 0	2.Tag	4.Tag	6.Tag	10.Tag
+ 2 s	0,757	0,671	1,220	0,649	0,770
$\bar{x}$	0,465	0,386	0,600	0,369	0,430
- 2 s	0,133	0,101	-	0,090	0,089

Es wurden von 13 weiblichen Kaninchen für jede einzelne Aminosäure ein Mittelwert berechnet, der für den jeweiligen Tag der Entnahme die Konzentrationsänderung zum Ausgangswert angibt. Daneben wurden + 2 Standardabweichungen für den jeweiligen Mittelwert berechnet und angegeben.

Tabelle V

Aminosäuren	0/2.Tag	0/4.Tag	2./4.Tag	4./6.Tag	6./10.Tag
Asparagins.	> 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	> 0,05
Threonin/Ser.	" 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Glu.S.	" 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,01	> 0,05
Prolin	" 0,05	< 0,05	< 0,03	> 0,05	> 0,05
Glycin	" 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Alanin	" 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05
Cystin	" 0,05	> 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,05
Meth.	" 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05
Val.	" 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Isoleu.	" 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,05
Leucin	" 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,05	> 0,05
Thyrosin	" 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05
Phenylal.	" 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Lysin	" 0,05	< 0,05	X 0,01	< 0,01	> 0,05
Histidin	" 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
Gly.Meth.E.:	" 0,05	> 0,05	< 0,01	< 0,01	> 0,05
Arg.	" 0,05	> 0,05	< 0,01	> 0,05	> 0,05

In der vorliegenden Tabelle wurde statistisch die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Veränderungen vom Ausgangswert zum 2. und 4.Tag, vom 4. zum 6.Tag und vom 6. zum 10. Tag errechnet.

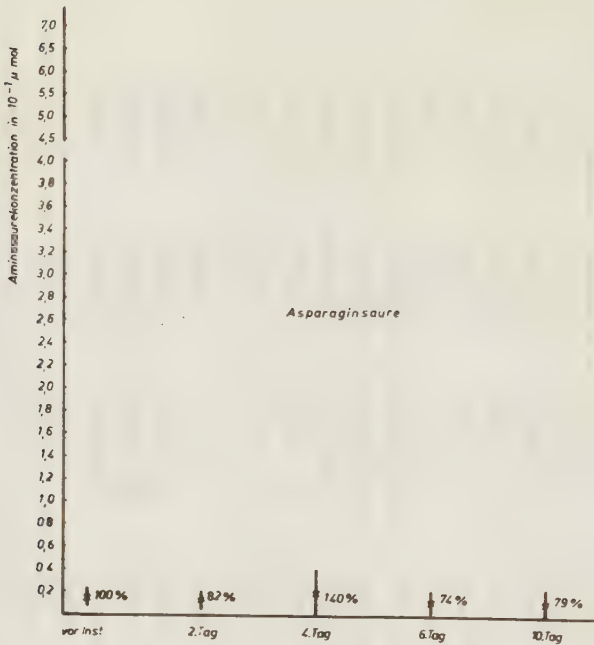


Diagramm II

Für Asparaginsäure wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt* Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Asparaginsäure:

Die Aminosäurekonzentrationen vermindern sich zum 2. Tag um 18%. Es erfolgt ein statistisch signifikanter Anstieg zum 4. Tag und ein Abfall zum 6. Tag nach Radiogoldgabe. Dieser Abfall ist ebenfalls statistisch signifikant. Bis zum 10. Tag wird ein leichter Konzentrationsanstieg ermittelt.

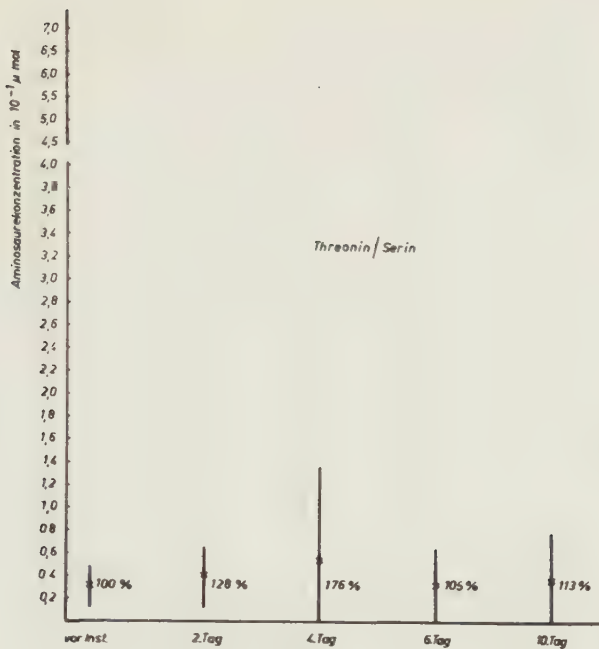


Diagramm III

Für Threonin/Serin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäuren.

Threonin/Serin:

Infolge der mangelhaften Auftrennung dieser Säuren werden beide in Summen angegeben. Es lässt sich bereits am 2. Tag ein Konzentrationsanstieg ermitteln, der am 4. Tag seinen Gipfel erreicht. Die Konzentrationswerte erreichen am 6. Tag wieder das Niveau des Ausgangswertes, um bis zum 10. Tag wieder leicht anzusteigen. Eine statistische Signifikanz konnte bei diesen Werten nicht ermittelt werden.

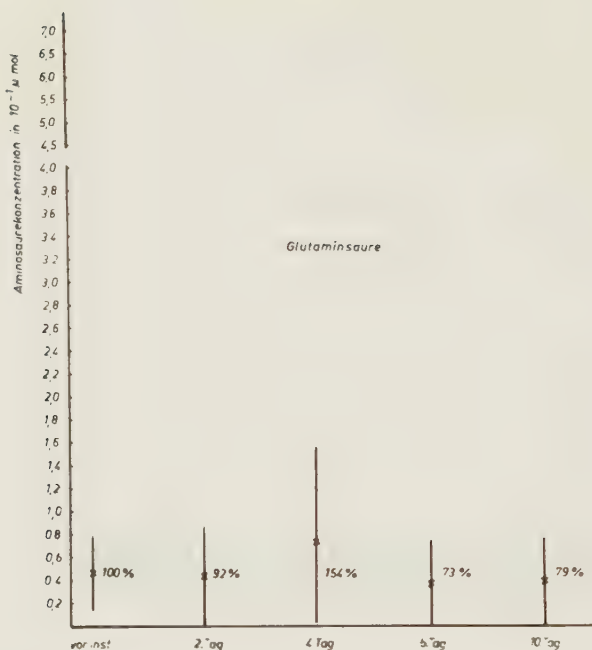


Diagramm IV

Für Glutaminsäure wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Glutaminsäure:

Am 2. Tag vermindern sich die Aminosäurekonzentrationen auf 92%, um dann am 4. Tag signifikant auf 154% anzusteigen. Zum 6. Tag kommt es zu einem starken Abfall, bei dem eine statistische Signifikanz ermittelt werden konnte, um dann bis zum 10. Tag wieder leicht anzusteigen.

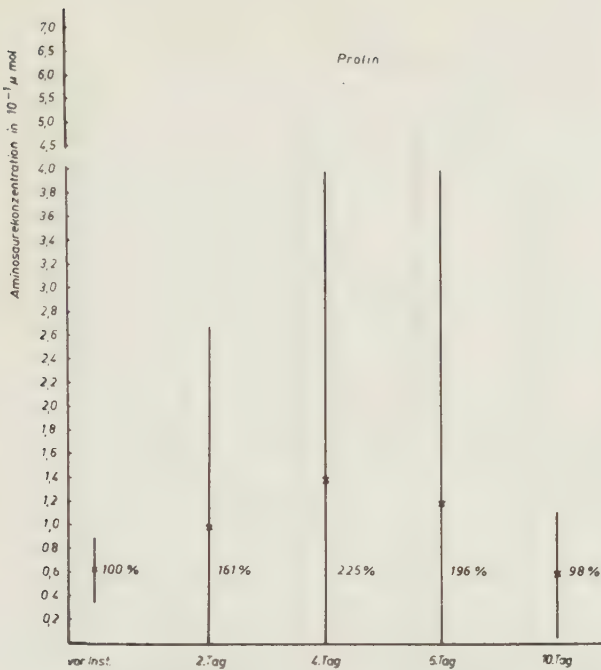


Diagramm V

Für Prolin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert=(100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigte Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Prolin:

Prolin läßt bereits am 2. Tag einen starken Konzentrationsanstieg erkennen, der bis zum 4. Tag einen Wert von 225% erreicht. Dieser Anstieg ist statistisch signifikant. Es erfolgt dann wieder ein Abfall bis zum 10. Tag auf das Ausgangsniveau.

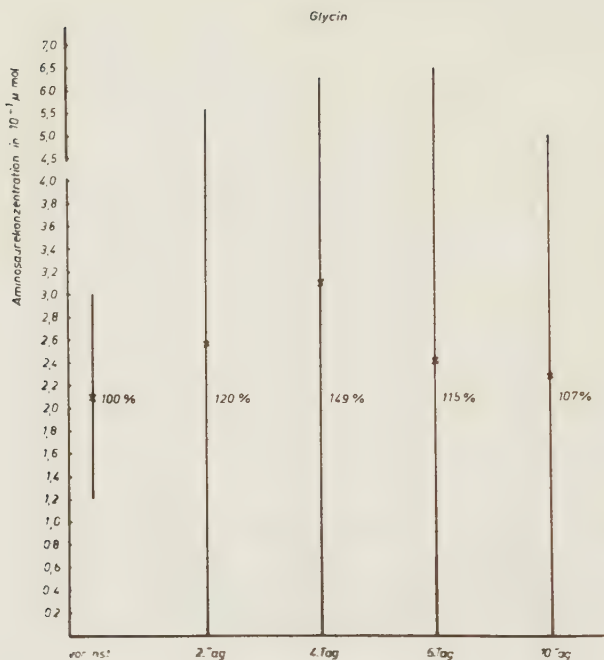


Diagramm VI

Für Glycin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Glycin:

Glycin steigt am 2. Tag bereits an, erreicht am 4. Tag seinen Konzentrationsgipfel, um dann wieder zum Ausgangswert abzufallen. Die biologische Streuung bei dieser Aminosäure ist erheblich. Eine Signifikanz konnte nicht ermittelt werden. Die starke Streuung ist methodisch nicht erklärbar.

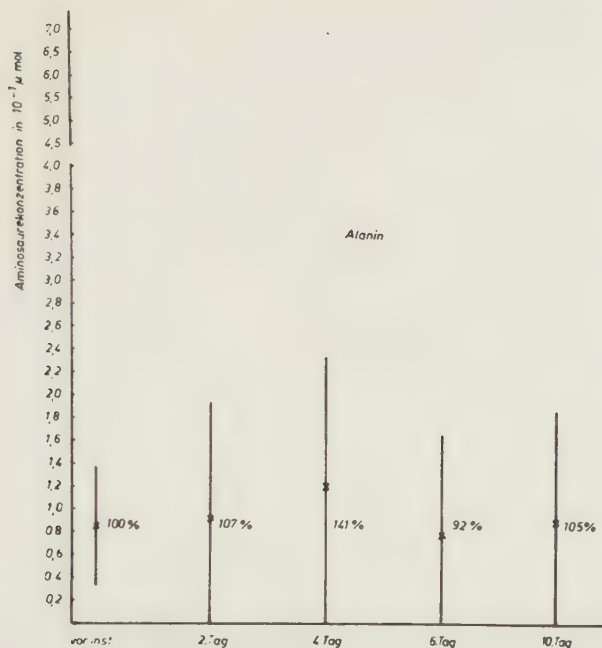


Diagramm VII

Für Alanin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigte Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Alanin:

Bei Alanin ist ein leichter Anstieg am 2. Tag zu objektivieren. Am 4. Tag wird ein Konzentrationsmaximum erreicht, welches statistisch signifikant ist. Zum 6. Tag hin wird ein signifikanter Abfall auf den Ausgangswert ermittelt, der sich bis zum 10. Tag auf diesem Niveau hält.

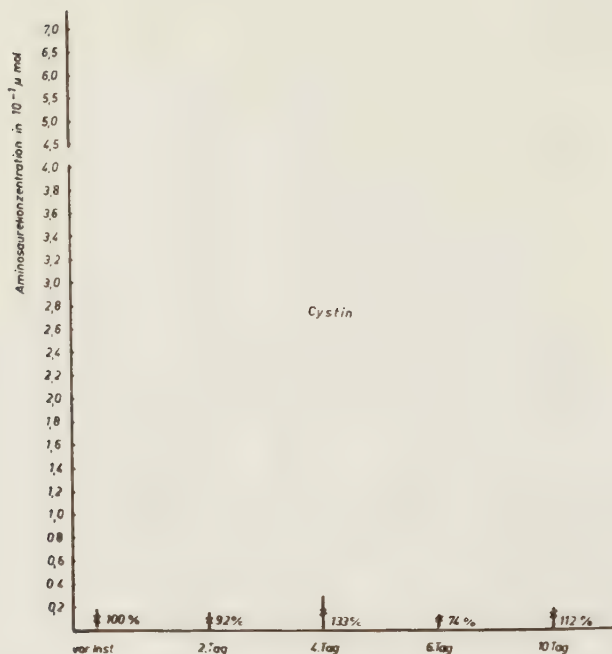


Diagramm VIII

Für Cystin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Cystin:

Cystin kommt nur in geringen Mengen vor. Es zeigt die typische Konzentrationsverminderung am 2. Tag, einen signifikanten Anstieg zum 4. Tag, um dann wieder zum 6. Tag hin signifikant abzufallen. Es erfolgt bis zum 10. Tag wieder ein leichter Anstieg, der etwas über den Ausgangskonzentrationswerten liegt.



Diagramm IX

Für Methionin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Methionin:

Auch die Methioninkonzentration im Kaninchenblutserum ist gering. Es erfolgt ein Anstieg am 4. Tag auf 130%, um dann bis zum 6. Tag wieder signifikant abzufallen. Zum 10. Tag hin erfolgt ein erneuter signifikanter Anstieg auf 149%.

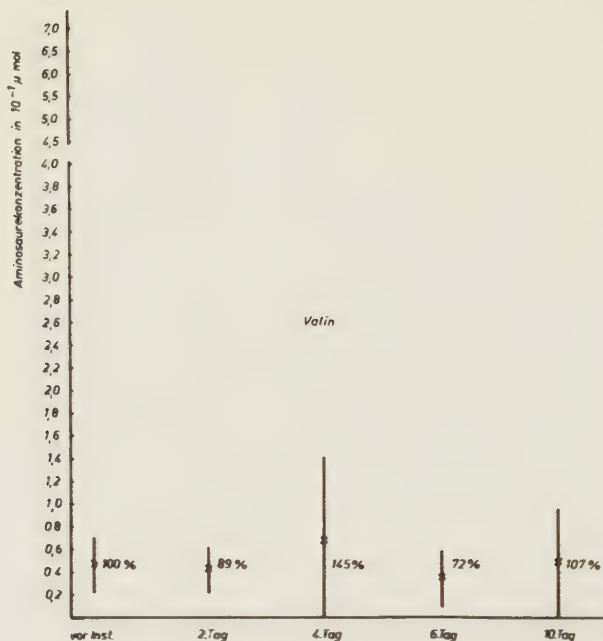


Diagramm X

Für Valin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Valin:

Bei Valin können Konzentrationsvermindierungen am 2. Tag und eine Erhöhung zum 4. Tag objektiviert werden. Danach erfolgt wieder ein typischer Abfall zum 6. Tag. am 10. Tag ist etwa der Ausgangskonzentrationswert wieder erreicht. Diese Veränderungen vom 4., 6. und 10. Tag sind statistisch signifikant.

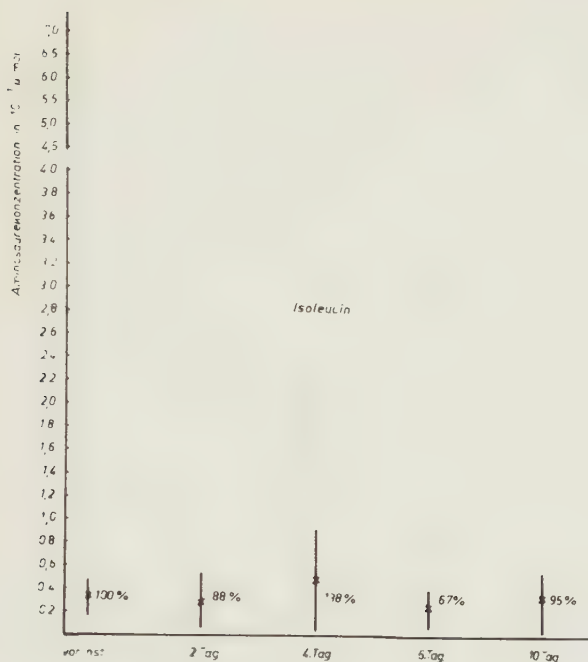


Diagramm XI

Für Isoleucin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Isoleucin:

Auch hier zeigt sich der typische Verlauf nach Radiogoldgabe. Es kommt zu einem leichten Abfall der Konzentration am 2. Tag zu einer signifikant gesicherten Erhöhung am 4. Tag, die dann am 6. Tag von einem starken Abfall auf 67% gefolgt ist. Dieser Abfall und der darauf folgende Anstieg bis zum 10. Tag auf das Ausgangsniveau ist statistisch signifikant.

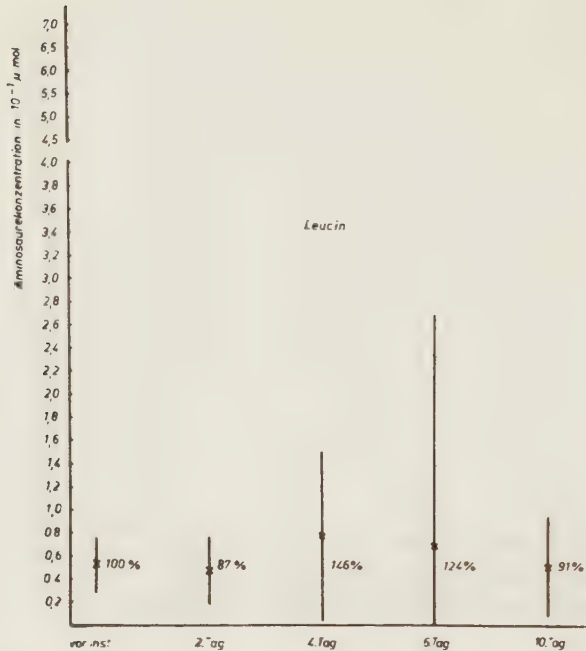


Diagramm XII

Für Leucin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Leucin:

Die Leucinkonzentrationen fallen am 2. Tag etwas ab, steigen dann am 4. Tag signifikant an, um dann bis zum 10. Tag kontinuierlich zur Ausgangsbasis abzufallen. Dieser Abfall läßt sich statistisch beweisen.

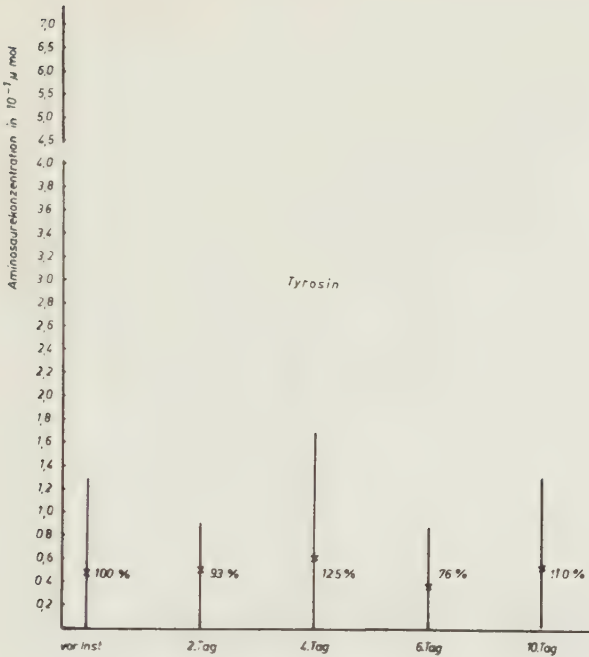


Diagramm XIII

Für Tyrosin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Tyrosin:

Tyrosin steigt bereits am 2. Tag um 20% an, erreicht am 4. Tag seinen Gipfel. Diese Konzentrationserhöhung erweist sich als signifikant. Das gleiche gilt auch für den sich daran anschließenden Konzentrationsabfall auf 98%. Bis zum 10. Tag wird ein erneuter Anstieg gemessen.

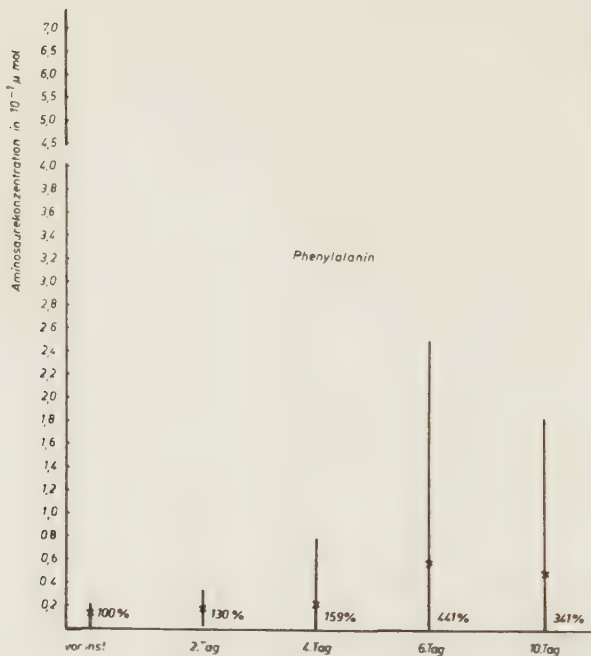


Diagramm XIV

Für Phenylalanin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigte Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Phenylalanin:

Diese Aminosäure reagiert mit einem kontinuierlichen Anstieg der Konzentrationen bis zum 6. Tag, um dann bis zum 10. Tag wieder leicht abzufallen. Ein statistischer Beweis kann für diese Aminosäure nicht erbracht werden.

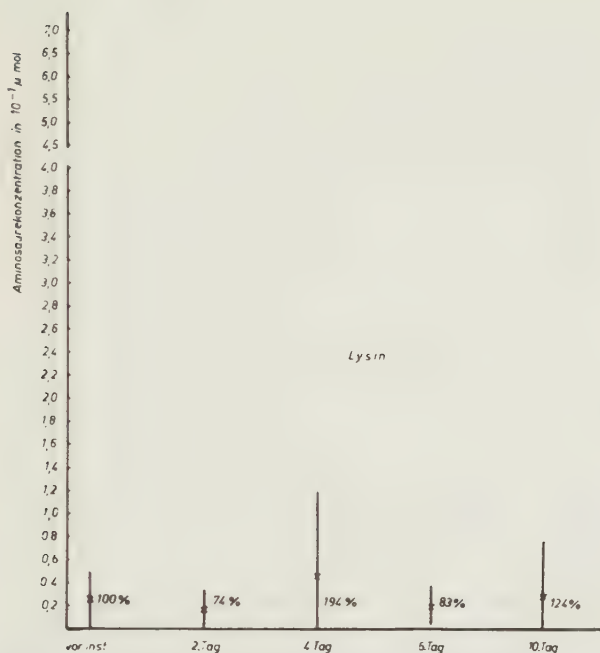


Diagramm XV

Für Lysin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigte Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Lysin:

Die Lysinwerte sind am 4. Tag signifikant erhöht, nachdem sich am 2. Tag eine leichte Verminderung erkennen läßt. Der 6. Tag ist von einem signifikanten Abfall auf 83% gekennzeichnet. Bis zum 10. Tag wird ein Wert von 124% erreicht.

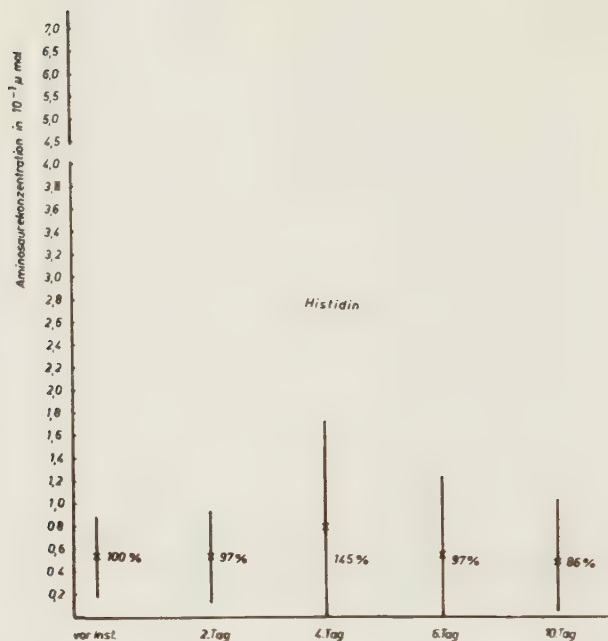


Diagramm XVI

Für Histidin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Histidin:

Die Histidinwerte zeigen am 2. Tag nur eine geringe Verminderung, dafür kommt es aber zu einem Anstieg der Konzentrationen am 4. Tag. Am 6. und 10. Tag liegen die Konzentrationswerte etwas unter dem Ausgangsniveau. Ein statistischer Beweis läßt sich für diese Veränderungen nicht erbringen.

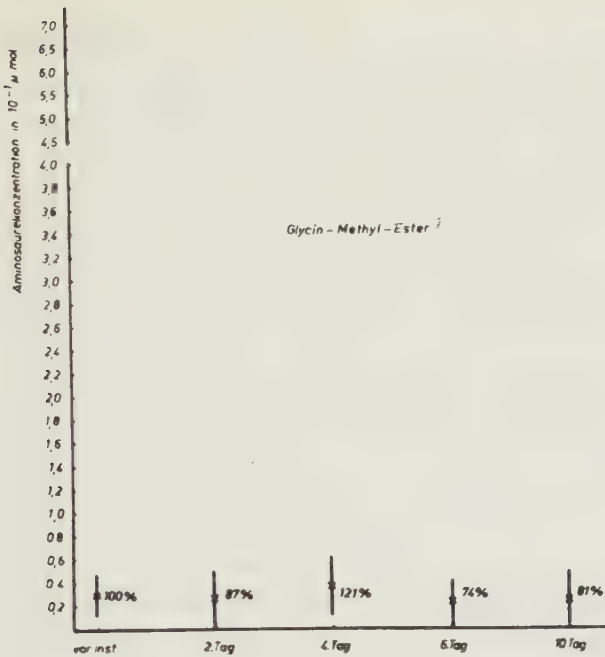


Diagramm XVII

Für Glycin-Methyl-Ester wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für Glycin-Methyl-Ester.

Glycin-Methyl-Ester: ²

Glycin-Methyl-Ester weist nur geringe Konzentrationsänderungen auf. Der Anstieg auf 121% und der anschließende Abfall auf 74% am 6. Tag lassen sich statistisch beweisen. Am 10. Tag haben die Konzentrationen die Ausgangsbasis noch nicht ganz erreicht.

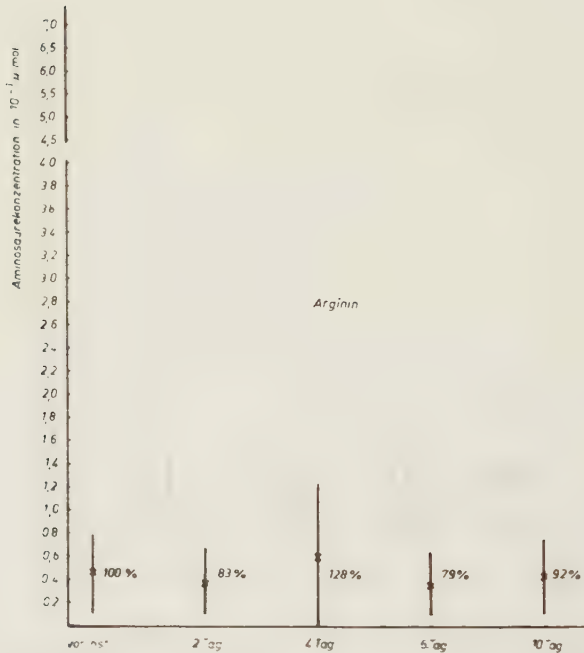


Diagramm XVIII

Für Arginin wurden auf der Abzisse die jeweiligen Entnahmetage und die Konzentrationsänderung vom Ausgangswert (=100%) aufgetragen. Die Ordinate zeigt Mittelwerte und Streuung für diese Aminosäure.

Arginin:

Bei der letzten in den Chromatogrammen erscheinenden Aminosäure, dem Arginin, läßt sich nochmals der typische Verlauf nach Radiogold-Applikation aufzeigen. Nach einer leichten Senkung am 2. Tag wird eine statistisch signifikante Erhöhung auf 128% registriert. Der 6. Tag ist von einem Konzentrationsminimum gekennzeichnet. Bis zum 10. Tag wird fast der Ausgangswert wieder erreicht.

DISKUSSION

Nach Gabe von kolloidalem Radiogold in therapeutischen Dosen in die freie Bauchhöhle werden alle Bauchorgane und Nachbarorgane des Bauchraumes einer erheblichen Strahlenbelastung unterworfen. Die gesamte Fläche des Bauchraumes ist dabei einer intensiven Elektronenbestrahlung durch Beta-Strahlung ausgesetzt. Nach K e p p und H o f m a n n (1960) beträgt sie auf der Serosa 4000 rad, im Netzbereich 6000 rad, in den retroperitonealen Lymphknoten sogar 10.000 - 30.000 rad, während Leber und Milz als Zentren der Proteinsynthese eine mittlere Strahledosis von 1.000 rad (Leber) und 500 rad (Milz) erhalten. Bei allen anderen Organen, die vor allem durch die Gamma-Strahlung belastet werden, beträgt dieser Wert etwa 750 rad. Bei den vorliegenden Versuchen wurden bei den dreizehn weiblichen Kaninchen am zweiten Tag nach der Radiogoldgabe eine Abnahme der freien Aminosäure-Konzentration im Blutplasma gefunden. Diese strahlenbedingte Abnahme deckt sich mit den Versuchen von B o h u o n (1963), der neben einer Vermehrung einzelner Aminosäuren ebenfalls eine Verminderung nach Ganzkörperbestrahlung bei Mäusen fand. Auch M e l c h i n g , L a n g e n d o r f f und S t r e f f e r (1961) haben diese Beobachtungen bei einzelnen Aminosäuren gemacht. Es kam bei ihren Versuchen zu einer vorübergehenden Verminderung der Aminosäure-Konzentrationen der Ratten. Diese Verminderung der Aminosäure-Konzentration* im Gewebe als auch im Plasma scheint einmal für eine Hemmung der Biosynthese in der Zelle zu sprechen. Versuche an Knochenmarkszellen von U y e k i und K e y (1960), die nach Bestrahlung eine Abnahme von markiertem Leucin in dem Protein um 40% zu diesem Zeitpunkt nachwiesen, sprechen für diese Tatsache. Wenige Stunden nach einer Bestrahlung haben mehrere Autoren (M e l c h i n g , L a n g e n d o r f f und S t r e f f e r 1961, K a y 1957) im

*sowohl

Experiment eine vermehrte Ausscheidung von Aminosäuren oder deren Endprodukte (Taurin) innerhalb der ersten 48 Stunden im Urin nachweisen können, der dann am vierten Tag eine deutliche Abnahme erfolgte. Die Einstellung auf ein konstantes Niveau trat erst nach dem zehnten Tag ein. Gleichzeitig hat C a s t a n o - A l m e n d r a l (1967) eine Steigerung der Enzymaktivitäten im Urin aufgezeigt. Kurz nach einer Bestrahlung tritt eine Tonusveränderung und Veränderung der Motilität des Darmes auf. Diese Darmveränderungen werden in den nächsten Tagen immer deutlicher, um dann am dritten Tag ihre Ausgangswerte wieder zu erreichen (C o n r a d 1956). Die ersten histologisch wahrnehmbaren Zeichen einer Strahlenschädigung lassen sich bei dieser Dosis nach frühestens ein bis zwei Tagen objektivieren. Veränderungen der Ultrastruktur der Darmzellen, Störungen des Mitochondrienaufbaues und vor allem Zellmembranschädigungen haben elektronenoptisch Q u a s t l e r und H a m p t o n (1962) nachgewiesen. Durch diese radiogenen Epithelläsionen kommt es zu einer Beeinträchtigung mannigfaltiger funktioneller Leistungen des Darmepithels. So fanden D e t r i c k und Mitarbeiter (1955) eine Einschränkung der Glukoseresorption, C u l l i v a n (1961) die der Fettresorption und C u r r a n , W e b s t e r , H o o s e p e a n und C o l o m o n (1959) eine erhebliche Beeinträchtigung der Wasser- und Natriumresorption. Daneben läßt sich der Verlust von Eiweiß und Wasser in das Darm-lumen experimentell nachweisen (C u r r a n , W e b s t e r und C o l o m o n 1959).

Für den gesteigerten Abgang von Plasmaproteinen durch die Darmwand ist aber auch neben der strahlenbedingten Permeabilitätsstörung der Darmwand die der Blutgefäße verantwortlich zu machen (W i t s c h i , B a r a n d u n und C o t t i e r 1962) . Die Kapillarpermeabilität nimmt erheblich zu. Es kommt zu diesem Zeitpunkt zu einem vermehr-

ten Austritt von Eiweiß- und Aminosäuren in den extrazellulären Raum, einer sogenannten "Dysorose" (G e r s t - n e r und B r o c k s 1955). Auch die Belastung der Nieren durch ionosierende Strahlen führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit in den Glomerulaschlingen. Als Folge ist eine vermehrte Eiweißausscheidung im Urin zu registrieren (C a s t a n o - A l m e n d r a l 1967, M e l - c h i n g 1961). Ein vermehrter Abbauprozess innerhalb des Proteinstoffwechsels liegt zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor. Der vierte Tag nach der Instillation bringt eine deutliche Erhöhung der Konzentrationen freier Aminosäuren in der vorliegenden Versuchsreihe. Kennzeichnend für diesen Zeitraum sind Entzündungserscheinungen in der Darmwand und das Einwandern pathogener Keime durch das Darmendothel (C o n g d o n , W i l l i a m s , H a b e r - m a n n und L o r e n z 1955). Durch diese Entzündungsvorgänge wird der Proteinstoffwechsel aktiviert, Ab- und Umbauvorgänge führen zu einem vermehrten Auftreten freier Aminosäuren im Blutplasma. Leber und Milz als Zentren des Proteinstoffwechsels tolerieren selbst hochdosierte Lokalbestrahlungen ohne tiefgreifende histologisch wahrnehmbare Schäden (P o h l e und B e n t i n g 1932, A r i e l 1951 und G e r s h b e i n 1956). Man beobachtet mikroskopisch lediglich leichte Quellungen an der Leberzellmembran, sowie eine feintröpfige Lipoideinlagerung im Zytoplasma. Anders dagegen reagiert das Nierengewebe. Nach Untersuchungen von C o t t i e r (1961) finden sich die ersten histologisch wahrnehmbaren Veränderungen in den Glomerulaschlingen. Hier kommt es während der ersten Tage zu einer Hyperämie, die die erhöhte Eiweißausscheidung am zweiten Tag zur Folge hat. Am dritten Tag dagegen sind Schwellungs- und Quellungszustände an den Endothel- und Deckzellen der Glomerulaschlingen zu objektivieren. Diese Quellungsvorgänge finden sich auch im Bereich des Tubulusepithels. Sie verhindern ein vermehrtes Ausscheiden der

freien Aminosäuren, so daß es dadurch zu einer Konzentrationserhöhung im Blutplasma kommt. Infolge dieser Quellungsvorgänge im Bereiche der Glomerula und Tubuli der Nieren werden, wie K a y (1957), L a n g e n d o r f f, S t r e f f e r, M e l c h i n g (1961) fanden, im Urin nach anfänglich vermehrter Ausscheidung von Aminosäuren, nach dem vierten Tag diese nur noch in geringen Mengen ausgeschieden. Eine Normalisierung der Verhältnisse trat erst nach dem zehnten Tag bei ihren Versuchen auf. Diese Quellungs- und Schwellungszustände klingen jedoch rasch wieder ab. Auch im Milzgewebe bestrahlter Ratten kann M e l c h i n g (1965) in diesem Zeitabschnitt nach Ganzkörperbestrahlung erhöhte Konzentrationswerte messen. Dieser allgemeine Anstieg des Gehaltes der freien Aminosäuren ist auch durch eine strahlenbedingte Aktivierung proteolytischer Fermente bedingt (H a g e n 1961). C a s t a n o - A l m e n d r a l und Mitarbeiter (1967) haben eine erhöhte Ausscheidung von Aminoepdidase und alkalischer Phosphatase nach intraperitonealer Radiogoldapplikation zu diesem Zeitpunkt ebenfalls aufgezeigt. Andererseits ist aber auch eine Hemmung in der Biosynthese der Proteine und des Abbaues dieser freien Aminosäuren durch enzymatische Vorgänge (L a n g e n d o r f f und S t r e f f e r 1965) möglich. C o t t i e r (1961) konnte elektronenoptisch Thrombozytenhäufung und Thrombenbildungen in den Gefäßen nachweisen, die aber in kurzer Zeit wieder abgebaut waren.

Bereits am sechsten Tag nach der Radiogoldgabe ist ein deutlicher Konzentrationsabfall bei den vorliegenden Messungen zu objektivieren. Bis zum zehnten Tag werden bei fast allen Aminosäuren die Ausgangskonzentrationswerte erreicht. Auch C a s t a n o - A l m e n d r a l, P a e s c h k e und von Z e t z s c h w i t z (1966) haben nach intraabdominal applizierter Radiogoldgabe

nach einer kurzen Verminderung des Gesamteiweißes einen Tag nach der Instillation und einer Aktivitätssteigerung der Transaminasen und Dehydrogenasen bis zum zwölften Tag eine Normalisierung dieser strahlenbedingten Veränderungen aufgezeigt. Alle diese genannten Autoren erhielten eine Normalisierung dieser strahlenbedingten biochemischen Veränderungen im Gewebe, Blutplasma und Urin nach dem zehnten Tag. Lediglich B o h o u n (1963) erreicht bereits am siebten Tag annähernd normale Konzentrationsverhältnisse nach Ganzkörperbestrahlung. Diese Versuche decken sich mit den vorliegenden Ergebnissen. Sie sprechen für eine leichte, vorübergehende Beeinträchtigung der Leber- Milz und Nierenfunktion und gegen eine tiefgreifende Schädigung der Organe. Eine therapeutische Dosis in dieser Größenordnung wird von allen diesen Organen toleriert. Die in dieser Arbeit beschriebenen und gefundenen Verhältnisse im Aminosäurespektrum bestätigen diese Tatsache, wenn auch die Deutung dieser Veränderungen noch als zu unzureichend anzusehen ist. Weitere Versuche zur Deutung dieses Phänomens, der Verminderung der Konzentrationen am zweiten Tag, der nachfolgenden Erhöhung am vierten Tag mit seinem anschließenden Abfall bis zum zehnten Tag werden z.Zt. mit Hilfe von Aminosäuregaben zu diesem Zeitpunkt durchgeführt, sodaß eine endgültige Deutung erst nach Abschluß dieser Versuchsreihen möglich ist.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aminosäurekonzentrationen nach intraabdominaler Applikation von ^{198}Au bestimmt, wobei Blutentnahmen aus der Ohrarterie der Kaninchen kurz vor der Radiogoldgabe, sowie am zweiten, vierten, sechsten und zehnten Tag nach der Instillation vorgenommen wurden. Die Enteiweißung der Seren erfolgte nach einer von C r a f t angegebenen Methode.

Die qualitative und quantitative Trennung wurde mit Hilfe eines von S t e i n und M o o r e angegebenen Verfahrens vorgenommen, das auf dem Ionenaustauschprinzip beruht. Nach Ablauf einer Ninhydrinreaktion wurden die achtzehn gewonnenen Aminosäuren kolorimetrisch bestimmt und automatisch registriert.

Von dreizehn weiblichen Kaninchen wurden 65 Serumproben entnommen und die darin befindlichen freien Aminosäuren bestimmt. Bei fast allen Aminosäuren konnte bis auf Threonin Serin, Phenylalanin, Thyrosin, Alanin, Glycin und Prolin eine Konzentrationsverminderung am zweiten Tag nach der Radiogoldgabe gemessen werden. Bei fast allen Aminosäuren fand sich eine statistisch gesicherte Erhöhung der Konzentrationswerte am vierten Tag, die von einem Abfall am sechsten Tag gefolgt waren. Dieser Abfall der Aminosäurekonzentrationen erwies sich bei fast allen Aminosäuren signifikant. Bis zum zehnten Tag wurde in der vorliegenden Versuchsreihe ein Anstieg der Konzentration beobachtet. Es wurde in den meisten Fällen die Ausgangsbasis wieder erreicht. Nur wenige Aminosäurewerte lagen am zehnten Tag etwas über oder leicht unter dem Ausgangsniveau. Diese Veränderungen nach Instillation von kolloidalem Radiogold, wobei Strahlendosen in therapeutischer Höhe (2mCi/kg Körpergewicht) angewandt wurden, lassen den Schluß zu, daß trotz hoher Strahlenbelastung durch die Beta- und Gammastrahlung eine länger dauernde

Beeinträchtigung des Eiweißstoffwechsels nicht zu erwarten ist. Da bereits am zehnten Tag nach der Radiogoldgabe eine weitgehende Normalisierung des Aminosäurespektrums aufgezeigt werden konnte, kann eine stärkere Organschädigung, insbesondere der Leber und Milz, im Hinblick auf den Eiweißstoffwechsel bei dieser Applikationsart und Strahlendosis nicht angenommen werden.

LITERATUR

A b d e r h a l d e n u. Mitarbeiter: Der Abbau und die Resorption artfremden Eiweißes durch den Organismus. Zschr. physiol.Chem. 83 (1913)

A r i e l J.M.: The effect of single massive doses of roentgen radiation upon the liver. Radiology 57, 561 - 575 (1951)

B o h o u n , C., D e l a r u e J.C., T u b i a n a M.: Modifications des aminoacides plasmatiques libres chez la Souris C_3H apres irradiation. C.R. Acad.Sci. 257, 4227 Nr. 26 (1963)

C a s t a n o - A l m e n d r a l A., P a e s c h k e K.D. u. v o n Z e z s c h w i t z G.: Untersuchungen über die Nebenwirkungen des intraperitonealen applizierten Radiogoldes auf Plasmaprotein und Enzyme. Dtsch. Roentgenkongreß 1967 S. 355 Teil B (1967)

C a s t a n o - A l m e n d r a l A., M ü l l e r - H e i n e F. u. B e r g m a n n H.: Die Ausscheidung von Aminopeptidase und alkalischer Phosphate im Urin nach der intraperitonealen Radiogold-Applikation. Dtsch. Roentgenkongreß 1967 Teil B 370 (1967)

C o n a r d R.A.: Effect of x-irradiation on intestinal mobility of the rat. Amer. J. Physiol. 165, 375-385 (1951)

C o n a r d R.A.: Some effects of ionizing radiation on the physiologie of the gastrointestinal tract. Radiat Res. 5, 165-188 (1956)

C o n g d o n C.C., F. P. W i l l i a m s , H a b e r - m a n u. L o r e n z : The histopathologie of bacterial infection in irradiated mice. J.nat. Cancer Inst. 15, 855 - 876 (1955)

C o t t i e r, H.: Histopathologie der Wirkung ionisierender Strahlen auf höhere Organismen. Handbuch der med. Radiologie (Strahlenbiologie) Bd.II 139 ff (1966)

C r a f t , M., R e i d , R.H.P., R o b e r t s , E.C.G. u. W i s e : Eine Methode zur Bestimmung der Aminosäuren ohne Fällung der Serumproteine. Int.Technicon Symposium: Automation in der Analyt.Chem. (1965)

C u r r a n , W e b s t e r , H o o s e p e a n S o l o m o n : Sodenin and water transpert in rat ileum after acute abdominal irradiation. IX.Int. Kongreß Radiol. München 1959

D e t r i c k u.Mitarbeiter: Influences of x-ray irradiation on glucose transpert of the rat intestine Radiat. Res. 2 483-489 (1955)

D o c u m e n t a Geigy, Wissenschaftliche Tabellen 6. Auflage S. 170, 23 (1960)

E a s t o e , I.E.: A semi-mikro method for the determination of amino acids by ion-exange chromatographie. Biochem. J., London 79 652 - 656 (1961)

G e r s t n e r , H.B. u.P.M. B r o o k s : Effects of x-radiation on flow of perfusion fluid through isolatid rabbits ear. Fed.Proc. 14,56 (1955)

G e r o k , W.: Quantitative Bestimmung der freien und gebundenen Aminosäuren im Blutserum durch Elutionschromatographie an Ionenaustauschern. Kl.Wschr. Jg. 38 1212 (1960)

G e r s h b e i n , L.L.: x-irradiation and liver regeneration in partially hepatectomized rats. Amer. J. Physiol. 185, 245 - 249 (1956)

G l e n d n i n g , M.B., M a r g o l i s , A.J. u.
E.W. P a g e : Amino acid concentrations in fetal
and maternal plasma. Amer.J. Obstetr. Gynec. Band 81,
591 - 593 (1961)

G o r d a n u. Mitarbeiter: Endocrinologie 42, 153 (1948)

H a g e n , U.: Radiosensitivity of the glycolytic
enzymes in the nucleus. 2nd Int.Congr. Radiation Researd
Harrowgate (1962)

H e i n z , E.: Aktiver Transport von Aminosäuren.
Biochemie des aktiven Transports (12.Colloq. der Ge-
sellschaft f.Physiol. Chem. 13./15.4.1961 Mosbach/Baden)
Springer-Verlag 168-188 (1961)

H o l y , W.H.: Integration of amino-acid chromatography.
Handbuch der Fa. Technicon

K a y , R.E., J.C. E a r l y , C. E n t e n m a n n :
Increased Urinary Excretion of Taurine and Urea by
Rats after x-irradiation. Radiat Res. 6, 98 (1957)

K e p p , R., H o f m a n n , D.: Die Anwendung von
radioaktivem Gold in der gynäkologischen Strahlenthera-
pie. 111, 174 (1960)

K i r s t e n , E. u.R. K i r s t e n : Analytische
Chromatographie von Aminosäuren in der Größenordnung
des Nanamols. Biochem.Zschr..(Berlin) 339, 287-304(1964)

K n a u f f , H.G. u. P. S c h a b e r t : Zur quanti-
tativen Aminosäurebestimmung in Körperflüssigkeiten
und Organextrakten nach Elutionschromatographie an
Ionenaustauschersäulen mit automatischer Registrierung
der Ergebnisse. Kl. Wschr. Jg. 38, 1206 (1960)

K n a u f f , H.G., S e y b o l d , D. u. B. M i l l e r :
Die freien Plasma-Aminosäuren bei Lebercirrhose u.Hepati-
tis. Klin. Wschr. Jg. 42, Heft 7, 326-332 (1964)

K r a u t ;H., u. H. Z i m m e r m a n n : Die Verän-
derungen der einzelnen freien Aminosäuren im Blut und
Harn in Abhängigkeit von der Ernährung. Nutr.et.Dieta
(Basel) 4, 22 (1964)

L a d n e r ,H.A.: Zum Verhalten des Eiweißstoffwechsels
bei bestrahlten Tumorpatienten. Dtsch. Roentgenkongreß 1967
Teil B, 345 (1967)

L a d n e r , H.A., H a h n , K.: Strahlenbedingte Kon-
zentrationenänderungen freier Aminosäuren im Blutplasma
des Menschen. Naturwissenschaften 53 Nr. 9, 226 (1966)

L a n g e n d o r f f , H., M e l c h i n g , H.J. u.
S t r e f f e r : Veränderungen des Aminosäurestoff-
wechsels weißer Mäuse durch subletale Ganzkörperbe-
strahlung. 114, 525 (1961)

L a n g e n d o r f f , H., Ch. S t r e f f e r u.
H.J. M e l c h i n g : Untersuchungen über einen bio-
logischen Strahlenschutz, Strahlentherapie 124, 445 (1965)

L u c h , J.M.: Annual Reviews of Biochemistry Bd. 1
Kap. Aminosäuren und Proteine (1932)

M ü l l e r , I.H.: Möglichkeiten u. Erfolge mit radio-
aktivem Gold. Geburtshilfe und Frauenklinik 11,973 (1955)

N i e d , M.: Die Konzentration freier Aminosäuren im
Serum der Mutter und des Kindes zum Zeitpunkt der Geburt.
Inaug.Diss. (1967)

O e p e n , H. u. I. O e p e n : Geschlechtsspez. Konzentrationsunterschiede der Serum-Aminosäuren.

Klin. Wochenschr. Jg. 43, 211 (1963)

O e p e n , H. u. I. O e p e n : Vergleich der Aminosäurespektren unterschiedlich enteweißter Blutseren.

Klin. Wochenschr. Jg. 41, 920 (1963)

O e p e n , H. u. I. O e p e n u. L. L a n g b e i n : Elutionschromatographische Untersuchungen der Stabilität freier und gebundener Aminosäuren im menschlichen Vollblut. Klin. Wschr. Jg. 43 Heft 11, 622 (1965)

P o h l e , E. A. u. C. H. B u n t i n g : Studies of the effect of roentgen rays on the liver. Acta radiol (Stockholm) 13, 117 - 124 (1932)

Q u a s t l e r u. H a m p t o n : Effect of ionizing radiation on the fine structure and function of the intertinal epithelium of the mouse. Radiat Res. 17, 914 - 931 (1962)

R a p a p o r t , S. M. : Medizinische Biochemie , VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 424 ff. (1962)

S c h o e n h e i m e r , R. : The dynamic state of body constituents, Cambridge Mass. Kap. II u. III (1946)

van S l y k e , D. D. u. G. M. M e y e r : The fate of protein digestion products in the body. III. The absorption of amino acids from the blood by the tissues. J. Biol. Chem., Balt., 16, 197 - 212 (1913)

S o u p a r t , P. : Aminoacidemie et aminoacidurie au cours du cycle menstruel chez la femme normale. Clin. chem. Acta 5 , 235 (1960)

S p a c k m a n n, D.H., S t e i n, W.H. u.S.M o o r e :
Automatic recording apparatus for the chromatography of
amino acids. Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

S t a l d n e r, G., H. V e t t e r l i - B u c h n e r
u. H. B e r g e r : Untersuchungen über den renalen
Rückresorptionsmechanismus für Aminosäuren. Kl.Wschr.
Jg. 38, 278 (1960)

S t e i n, W.H. u. S. M o o r e : Chromatographie of
aminoacids on sulfonated polystyrene resins. J.Biol.Chem.
Balt., 192, 663 - 681 (1951)

S t e i n u. M o o r e : The free amino acids of human
blood plasma. J. Biol.Chem., Balt., 211, 907-915 (1954)

S t ö c k l, W., A. S t a c h e r u. M. W e i s e r :
Die klinische Bedeutung der Bestimmung freier Amino-
säuren im Blut. Beckmann report 1,3 (1967)

von S u l l i v a n, M.F.: Plasma protein less after
x-irradiation or nitrogen mustard administration.
Radiat.Res. Res. 12, 477 (1960)

von S u l l i v a n, M.F.: Absorption from gastroin-
testinal tract of the rat after x-irradiation.
Amer.J. Physiol. 201, 1013 - 1016 (1961)

T u r b a, A.: Aminosäuren und Peptide in: Hoppe-Syler/
Thierfelder: Handbuch der phys. und path.-chem.Analyse
10. Aufl. Bd. II, 1648 (1955)

U y e k i, E.M., K e y, H., S a l e r n o, P.R.:
In vitro leucine incorporation into protein of normal
and x-irradiated rabbit bone marrow cells.
Amer. J. Physiol. 198, 652 - 654 (1960)

W i t s c h i, H.P., B a r a n d u m u.H.C o t t i e r :
Zur Pathogenese der post irradiation Hypoproteinaemie.
Schweiz 50 med. Wschr. 92, 104 - 110 (1962)

Z i m m e r m a n n - T e l s c h o w , H. u. F. J e k a t :
Die Veränderungen der freien Aminosäuren im Nüchterserum
und im Harn in Abhängigkeit von der Ernährung beim Men-
schen. III. Ernährungsversuche mit Weizenbrot.
Nutr. et Dieta (Basel) 7, 283 (1965)

Z o l l i n g e r, H.K.: Histologische Befunde nach
experimenteller Röntgenbestrahlung der Niere. Schweiz Z.
Path. 14, 349 - 365 (1951)

Z o l l i n g e r, H.K.: Radio-Histologie und Radio-
Histopathologie zu: Handbuch der allgemeinen Pathologie
Bd. X/1 S.127 - 287 Berlin-Göttingen-Heidelberg
Springer 1960

LEBENS LAUF

Am 24.7.1934 wurde ich als Sohn des Polizeihauptwachmeisters Alfred Schwarz und seiner Ehefrau Lieselotte geb. Boldt in Hildburghausen/Thür. geboren. In meiner Heimatstadt besuchte ich die Volks- und Oberschule, die ich am 11.6.1954 mit dem Reifezeugnis verließ. Nach Bestätigung dieser in Mitteldeutschland abgelegten Reifeprüfung an dem Goethe-RealGymnasium in Frankfurt/M. habe ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg begonnen. Die Zeit meines Studiums verbrachte ich ausschließlich in Marburg und habe 1961 das Hochschulstudium mit dem medizinischen Staatsexamen dort abgeschlossen. Während meiner Medizinal-Assistentenzeit arbeitete ich im Kreiskrankenhaus Dillenburg und in der Univ.-Frauenklinik in Marburg. Anschließend war ich in der Klinik für Externe Therapie in Endbach tätig. Seit Januar 1966 bin ich Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle in der hiesigen Univ.Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

